REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER APS-KINASE AUS CHLAMYDOMONAS REINHARDTII CW 15

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

HANS-GEORG JENDER

Herne

Bochum 1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549226_0003

REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER APS-KINASE AUS CHLAMYDOMONAS REINHARDTII CW 15

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

HANS-GEORG JENDER

Herne

Bochum 1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Prof. Dr. A.Trebst

Koreferent: Prof. Dr. W.Hengstenberg

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1. Einleitung 1

2. Ergebnisse 5

2.1. Methode zur quantitativen Bestimmung von PAPS als Reaktionsprodukt der APS-Kinase 5

2.2. Vorkommen der APS-Kinase in Rohextrakten höherer Pflanzen, Algen und Bakterien 9

2.2.1. APS-Kinase-Aktivität in Grünalgen 9

2.2.2. APS-Kinase-Aktivität in höheren Pflanzen 12

2.2.3. APS-Kinase-Aktivität in Bakterien 13

2.3. Reinigung der APS-Kinase aus Chlamydomonas reinhardtii CW 15 15

2.3.1. Rohextrakt und Ammoniumsulfat-Fällung 15

2.3.2. Gelchromatographie 15

2.3.3. Chromatofokussierung 17

2.3.4. Affinitätschromatographie 18

2.3.5. Kontrolle der Reinheit 19

2.3.6. Zusammenfassung 19

2.4. Molekulare und kinetische Eigenschaften 21

2.4.1. Kinetik der APS-Kinase-Reaktion 21

2.4.2. pH-Optimum und Ionenbedürfnis 22

2.4.3. Kinetische Untersuchungen der enzymatischen Aktivität 26

2.4.4. Bindungsstellen für APS und ATP 33

2.4.5. Produkthemmung und Wirkung von Mononukleotiden 37

2.4.6. Spezifität für Nukleosid-triphosphate 45

2.4.7. Aktivierung durch Sulfit und Thiole 49

1. Einleitung

Bakterien und Pilze sowie photoautotrophe Organismen sind in der Lage, Sulfat zu assimilieren und den reduzierten Schwefel in organische Verbindungen einzubauen. Bei der Reduktion des hexavalenten Sulfatschwefels zum divalenten Sulfidschwefel wird die Oxidationsstufe des Sulfits (+4) durchlaufen. Wegen des sehr stark negativen Redoxpotentials für die Reaktion

$$SO_4^{2-} + 2\,H^+ + 2\,e^- \longrightarrow SO_3^{2-} + H_2O \qquad E_o' = -517\ mV$$

kann das Sulfat durch physiologische Reduktionsmittel wie Ferredoxin oder NADPH nicht direkt zum Sulfit reduziert werden, sondern muß zunächst aktiviert werden.

In einer ersten Reaktion entsteht aus Sulfat und ATP ein Adenylylsulfat, katalysiert durch die ATP-Sulfurylase (E.C. 2.7.7.4):

$$SO_4^{2-} + ATP \rightleftharpoons APS + PP_i \qquad G_o' = +\,11\ kcal/mol$$

Wegen des stark endergonen Charakters der Reaktion liegt das Gleichgewicht auf der Seite der Ausgangsprodukte. Um die Reaktionsprodukte aus dem Gleichgewicht zu entfernen, wird zunächst das entstehende Pyrophosphat durch eine Pyrophosphatase (E.C. 3.6.1.1) gespalten:

$$PP_i \longrightarrow 2\,P_i \qquad G_o' = -\,6\ kcal/mol$$

APS wird durch die Veresterung der Ribose mit einer Phosphatgruppe zu PAPS umgesetzt:

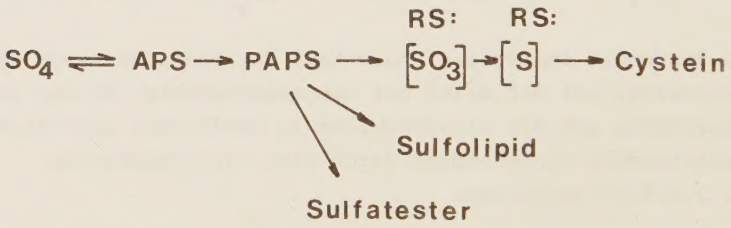
$$APS + ATP \longrightarrow ADP + PAPS \qquad G_o' = -\,5\ kcal/mol$$

Dieser zweite Aktivierungsschritt wird durch die APS-Kinase (E.C. 2.7.1.25) katalysiert und ist irreversibel.

Die Bildung von PAPS konnte in Pilzen (Robbins und Lipman 1958, Ragland 1959, Hilz und Kittler 1960), Bakterien (Kredich 1971, Trudinger 1969, Varma und Nicholas 1971), Algen (Hodson et al 1968, Møller und Evans 1974, Mercer et al 1974) und höheren Pflanzen (Mercer und Thomas 1969, Burnell und Anderson 1973) gezeigt wer-

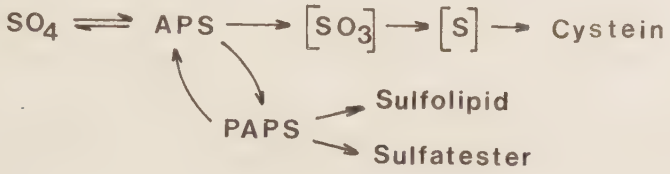
den, aber über die genaue Charakterisierung des enzymatischen Mechanismus der Reaktion liegen bisher keine Daten vor. Messungen an einer teilweise gereinigten APS-Kinase konnten nur an dem Enzym aus Hefe (Robbins und Lipman 1958), Nitrobacter (Varma und Nicholas 1971) und Chlamydomonas (Schwenn und Jender 1981) durchgeführt werden. Dies liegt zum einen daran, daß die APS-Kinase an das Membransystem der Thylakoide gebunden zu sein scheint (Burnell und Anderson 1973, Schwenn und Hennies 1975) und erst durch geeignete Methoden daraus gelöst werden muß. Zum anderen war es mit den bisherigen Meßmethoden (Übersicht bei Schwenn und Urlaub 1981) nicht möglich, die Aktivität des Enzyms durch die direkte Bestimmung von PAPS als Produkt der Reaktion zu messen.

Die Stellung der APS-Kinase in der gesamten Sequenz der assimilatorischen Sulfatreduktion ist umstritten. Für Enterobakterien und Pilze konnte übereinstimmend gezeigt werden, daß PAPS als Sulfonylgruppen-Donor für den Reduktionsschritt dient (Torii und Bandurski 1967, Wilson und Bierer 1976, Tsang und Schiff 1976a):



Bei den phototrophen Organismen ist die Frage strittig, ob die Reduktion von APS oder PAPS ausgeht. Von verschiedenen Autoren konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß auch hier PAPS als Donor der Sulfonylgruppe dient (Burnell und Anderson 1973, Schwenn et al 1979). Solche PAPS-abhängigen Sulfotransferasen würden die gleiche Funktion erfüllen wie eine für Hefe beschriebene PAPS-Reduktase (Bandurski 1965, Siegel 1975) und konnten in verschiedenen phototrophen Bakterien gefunden werden (Imhoff 1980, Schmidt und Trüper 1977).

Von Schiff und Mitarbeitern (Tsang und Schiff 1976d) sowie von Schmidt (Schmidt 1975, Schmidt 1976) und der Gruppe um Brunold (Brunold und Schmidt 1976, Jenni et al 1980) wird ein anderer Weg vorgeschlagen. Dabei dient APS als Sulfonylgruppen-Donor, wobei das APS Thiol-abhängig durch eine APS-Sulfotransferase zu Sulfit reduziert wird. Da PAPS nachweislich in zellfreien Extrakten aus Algen sowie in Chloroplasten synthetisiert wird, schlagen diese Autoren vor, daß PAPS zur Bildung von Sulfatestern und zur Sulfolipid-Bildung verwendet wird. Durch die Aktivität einer 3'Nukleotidase oder einer spezifischen Phosphatase kann PAPS via APS ebenfalls der Reduktion zugeführt werden (Schmidt 1978, Tsang und Schiff 1976b):



Da aus den bisherigen Untersuchungen bekannt ist, daß die Affinitäten beider Enzyme im Mikromolar-Bereich liegen (Schmidt 1976, Robbins 1962, Schwenn und Jender 1981), würde das Nebeneinander beider enzymatischer Aktivitäten zu einer Konkurrenz um ihr Substrat APS führen. Es sollten daher in der vorliegenden Arbeit vor allem zwei Fragen geklärt werden:

(a) sind die molekularen und kinetischen Eigenschaften einer gereinigten APS-Kinase in vitro geeignet, die vollständige Aktivierung des Sulfat zum PAPS zu gewährleisten?

(b) besteht zwischen beiden Enzymen eine regulatorische Kooperativität basierend auf einer metabolischen Steuerung oder strukturellen Organisation?

Dazu war es nötig eine geeignete Aufarbeitungsmethode zu finden, um die Enzyme aus der Struktur der Chloroplasten zu lösen

UNIV. LEIDEN BIBL.
UNIV. LEIDEN

und zu reinigen. Die genaue Untersuchung des Mechanismus der APS-Kinase-Reaktion sollte Aufschluß darüber geben, ob der Ablauf und die Steuerung der Katalyse derart sind, daß sie auch bei den ungünstigen in vivo Bedingungen eine optimale Umsetzung von APS zu PAPS ermöglichen. Da es bisher keine befriedigenden Testsysteme für die ATP-abhängige Bildung von PAPS aus APS gibt, war es darüberhinaus notwendig, eine neue Meßmethode zu entwickeln, die es ermöglichte, den Ablauf der Reaktion bei den zu erwartenden geringen Umsatzraten genau zu verfolgen.

2. Ergebnisse

Zu Beginn der Untersuchungen der APS-Kinase wurden die Enzymaktivitäten in nur teilweise gereinigten Extrakten verschiedener Organismen gemessen, um eine geeignete Quelle mit ausreichenden Enzymmengen zu finden. Da dabei auf die bereits bekannten Meßmethoden nicht zurückgegriffen werden sollte, da sie eine direkte Bestimmung von PAPS als Produkt der Reaktion nicht zulassen, mußte gleichzeitig eine neue Methode zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der APS-Kinase entwickelt werden.

2.1. Methode zur quantitativen Bestimmung von PAPS als Reaktionsprodukt der APS-Kinase

Die bisher zur Messung der Aktivität der APS-Kinase veröffentlichten Meßmethoden beruhten entweder auf der Bestimmung der Menge an gebildetem ADP in einem gekoppelten enzymatischen Test mit Pyruvat-Kinase und Lactat-Dehydrogenase (Burnell und Whatley 1975) oder der Messung von PAPS mit PAPS-spezifischen Phenolsulfotransferasen (Burnell und Anderson 1973). Damit war es nicht möglich, direkte Aussagen über die Reaktion der APS-Kinase zu machen. Andere Methoden zur Trennung von Nukleotiden wie Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose (Balasubramanian et al 1967) und DOWEX (Hodson et al 1968) waren relativ zeitaufwendig und die Empfindlichkeit war sehr gering.

Die hier entwickelte Methode zur Trennung von Nukleotiden mit Hilfe der Reversed-Phase HPLC ermöglichte die quantitative Abtrennung des Reaktionsproduktes PAPS von den übrigen Nukleotiden bei geringen Analysezeiten (15 Minuten) und hoher Empfindlichkeit (NG 200 pmol/ml). Dadurch war es erstmals möglich, die eigentliche enzymatische Reaktion der APS-Kinase durch die gebildete Menge an PAPS zu messen sowie außerdem die Hydrolyse des Substrates APS zu Sulfat und AMP und von ATP zu ADP und P_i zu bestimmen.

Quantitativ wurde das gebildete Nukleotid optisch bei 254 nm mit Hilfe eines an das Photometer gekoppelten Integrators bestimmt. Das Reaktionsprodukt wurde aus einem Enzymansatz durch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie herausgetrennt, so daß die

Peakfläche als Maß für die Konzentration separat integriert werden konnte. Zur selektiven Trennung der Reaktionsteilnehmer mußten für die HPLC die technischen Voraussetzungen geschaffen werden. Trennungen mit Hilfe von Ionenaustausch waren zu zeitaufwendig oder wie die Dünnschichtchromatographie für Routinemessungen nicht praktikabel. Die Nukleotide sind polare, in Wasser als Anionen vorliegende Substanzen. Mit Hilfe von Ionenpaarbildnern können sie entsprechend ihrer Ladung in apolare hydrophobe Komplexe umgewandelt werden, so daß sie mit apolaren Lösungsmitteln von einer "reversed-phase" Silicagel-Säule als stationärer Phase eluiert werden können. Für die Bildung von Ionenpaaren konnte tetra-Butylammonium-hydroxid (TBAH) verwendet werden, wobei sich n-Propanol als ausreichend elutrop in geringen Konzentrationen erwies. Die vollständige Trennung von ATP, ADP, APS, PAPS und AMP wurde mit Silicagel erreicht, bei dem C_{18}-Kohlenwasserstoff-Ketten zur Phasenumkehr dienten. Für die Routinemessungen erwies sich LiChrosorb RP18 mit der Korngröße 7 µ als stationäre Phase und n-Propanol (13%,v/v) mit 6 mM TBAH bei pH 9,8 als mobile Phase (Schwenn und Jender 1980) als zweckmäßig. Die Auftrennung eines Reaktionsgemisches zur Bestimmung von PAPS neben den übrigen Adenosinnukleotiden ist in Abb. 1 dargestellt.

Nukleotid	k'	
	pH 9,4	pH 10,0
5'AMP	0,29	0,345
3'AMP	-	0,431
ADP	1,217	1,015
3'5'PAP	2,895	2,556
ATP	-	2,697
APS	0,536	0,479
PAPS	3,914	3,914

Tab. 1: Verteilungskoeffizient für verschiene Nukleotide in Abhängigkeit vom pH-Wert

Nukleotid-Standards (jeweils 5 x 10^{-10} mol) wurden in Laufmittel gelöst und 50 µl Probe aufgegeben. Übrige Bedingungen siehe Methoden

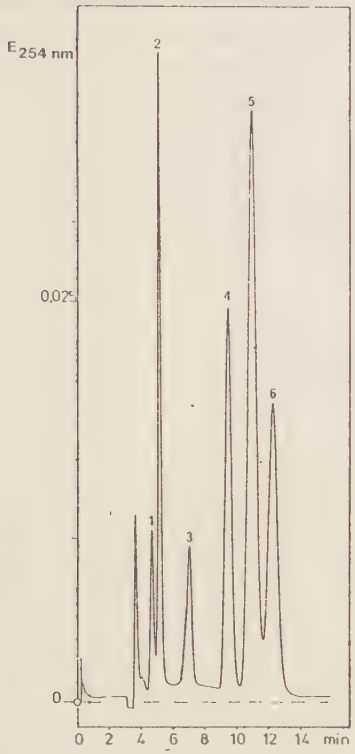


Abb. 1: Trennung von Adenosinnukleotiden mit Reversed-Phase HPLC

1-AMP, 2-APS, 3-ADP, 4-ATP, 5-PAP, 6-PAPS

Bedingungen s. Tabelle 1

Dabei wurden (in der Reihenfolge ihrer Retention) AMP, APS, ADP, ATP, PAP und PAPS nacheinander eluiert.

Die "paired-ion" Chromatographie an reversed-phase Silicagel erwies sich als außerordentlich reproduzierbar (Tab. 1), wobei der Verteilungskoeffizient k' von der Gesamtladung des Nukleotids abhing. Stark dissoziierte Gruppen innerhalb der Verbindung führten dabei zu einer Erhöhung der Retentionszeit, so daß die sulfatierten Nukleotide nach den entsprechenden phosphatierten eluiert wurden (APS nach AMP oder PAPS nach 3'5'PAP).

Zur Messung der APS-Kinase anhand des Reaktionsproduktes war neben der Selektivität gleichzeitig eine hohe Empfindlichkeit des Nachweises erforderlich, da die zu erwartenden Raten des Umsatzes in den Rohextrakten und Vorstufen der Reinigung niedrig sein konn-

ten. Deshalb wurde zur Erhöhung der Empfindlichkeit der Messungen ^{35}S-markiertes APS als Substrat eingesetzt. Zum Nachweis des entstandenen ^{35}S-PAPS diente ein Radioaktivitätsmonitor.

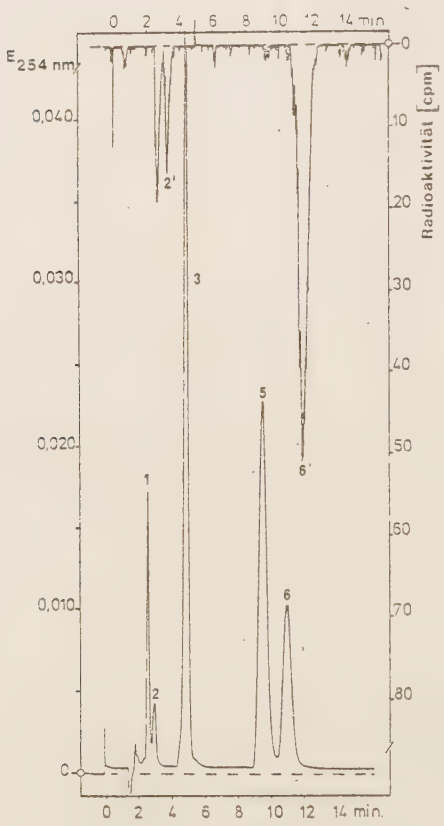


Abb. 2: Messung von Radioaktivität und UV-Absorption in der gleichen Probe

Peaks wie in Abb. 1; dazu 2'-^{35}S-APS, 6'-^{35}S-PAPS; Bedingungen s. Methoden

Da dieser Detektor unmittelbar hinter dem Photometer angeschlossen war, erhielt man gleichzeitig das Chromatogramm mit der optischen Dichte und der Radioaktivität (Abb. 2). Die Nachweisgrenze richtete sich nach der spezifischen Markierung des verwendeten ^{35}S-APS. In den routinemäßigen Messungen wurde ^{35}S-APS mit einer spezifischen Markierung von 30.000 cpm/nmol eingesetzt, so daß, nach Berücksichtigung der Verdünnungschritte im Reaktionsansatz

und in der Probenvorbereitung zur HPLC-Trennung, als untere Nachweisgrenze 5-10 pmol/25 µl erhalten wurde (zur Bestimmung der Radioaktivität siehe Methoden).

Die Trennung und Messung der Nukleotide mit der HPLC vereinigt eine hohe Reproduzierbarkeit mit geringen Analysezeiten (10 bis 15 Minuten pro Analyse) bei einer Empfindlichkeit von 200 nmol/l. Mit dieser Methode wurden die Eigenschaften der APS-Kinase aus verschiedenen Organismen untersucht.

2.2. Vorkommen der APS-Kinase in Rohextrakten höherer Pflanzen, Algen und Bakterien

2.2.1. APS-Kinase-Aktivität in Grünalgen

PAPS als aktiviertes Sulfat ist für Grünalgen von einer Reihe Autoren bereits beschrieben worden (Hodson et al 1968, Mercer et al 1974, Møller und Evans 1974). Durch die Untersuchungen von Schiff's Arbeitsgruppe (Schiff 1962, Hodson und Schiff 1969, Tsang und Schiff 1975) und von Schmidt (Schmidt 1972a, 1977a) war bekannt, daß Chlorella in großen Mengen PAPS bilden kann. Nach Vorversuchen (Schwenn und Jender 1981) konnte auch von Chlamydomonas reinhardtii erwartet werden, daß sie über die APS-Kinase verfügt, zumal die Alge zur gleichen Gattung wie Chlorella gehört. Die Mutante CW 15 der Alge war dabei von besonderem Nutzen, da sie keine feste Zellwand besitzt und deshalb leicht zur Extraktion von Proteinen zugänglich ist. Bei der Messung der APS-Kinase aus dieser Alge war damit zu rechnen, daß APS nicht nur durch die APS-Kinase verbraucht wurde, sondern daß gleichzeitig als konkurrierende Reaktion APS durch die "APS-Sulfotransferase"-Reaktion abgezogen werden konnte. Die Reaktion war von Schmidt (Schmidt 1972) bei der Alge Chlorella beschrieben worden. Die Aktivität der APS-Sulfotransferase katalysiert die Thiol-abhängige Spaltung von APS zu AMP und Sulfit.

Die Algen wurden durch osmotischen Schock aufgebrochen und die Enzyme durch Beschallen in Lösung gebracht. Zugabe von Bi-Sulfit zu den Aufarbeitungspuffern konnte die APS-Sulfotransferase-Aktivität nicht unterbinden, jedoch wirkte es als Oxidationsschutz

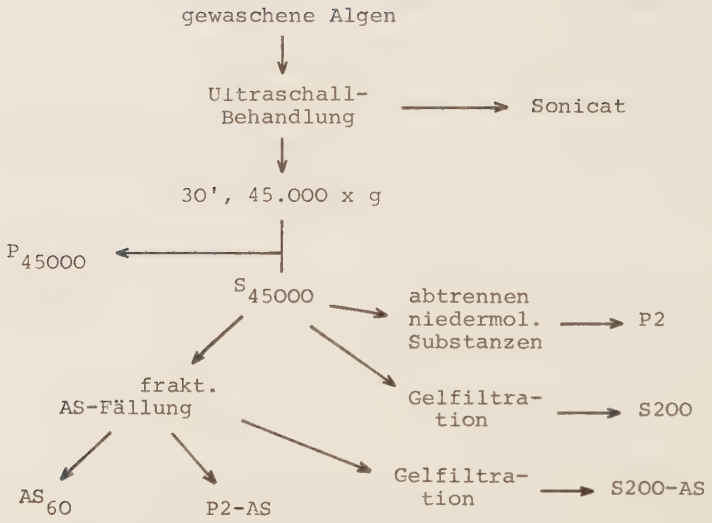


Abb. 3: Gang der Aufarbeitung zur Messung von APS-Kinase in Rohextrakten von C.reinhardtii

Einzelheiten siehe Methoden

für die APS-Kinase. Der Rohextrakt wurde entsprechend dem Schema in Abb. 3 aufgearbeitet und auf APS-Kinase und APS-Sulfotransferase untersucht. Dabei zeigte sich, daß durch die Ultraschall-Behandlung nahezu die gesamte Sulfotransferase-Aktivität in der Fraktion der löslichen Proteine (S_{45}) erhalten wurde (Tab. 2). Ebenfalls konnten 80% der APS-Kinase-Aktivität in der S_{45}-Fraktion wiedergefunden werden. Auffallend war die höhere Aktivität der APS-Kinase nach der Trennung von Partikeln und löslichem Protein im Vergleich zum Sonicat. Zusatz von 3'5'PAP stimulierte die Umsatzrate der APS-Kinase in der P_{45}-Fraktion um 70%, während die Aktivität in der S_{45}-Fraktion nicht beeinflußt wurde. Die Abtrennung der niedermolekularen Substanzen nach einer fraktionierten Ammoniumsulfat-Fällung (P2-AS) führte zu einer erhöhten Aktivität der APS-Sulfotransferase, während die Aktivität der APS-Kinase im Vergleich zu der Umsatzrate in der S_{45}-Fraktion konstant blieb.

	APS-Sulfotransferase [nmol SO_3/mg x h]		APS-Kinase [nmol PAPS/mg x h]	
	- DTE	+ DTE	- PAP	+ PAP
Sonicat	0,6	136,0	57,0	32,0
S_{45000}	3,6	103,0	95,0	96,0
P_{45000}	0,6	13,0	27,0	46,0
AS_{60}	39,0	221,0	255,0	217,0
P2	1,2	197,0	98,0	109,0
P2-AS	8,0	855,0	93,0	92,0
S200	21,0	373,0	175,0	189,0
S200-AS	40,0	545,0	577,0	732,0

Tab. 2: Verteilung von APS-Sulfotransferase- und APS-Kinase-Aktivität im Verlauf der Aufarbeitung

Der Gang der Aufarbeitung ist in Abb.4 dargestellt; ansonsten siehe Methoden

APS-ST: 25 mM Tris/Cl pH 8, 5 mM $MgCl_2$, 20 µM APS 1,2 mM DTE wenn angegeben;
APS-K.: 25 mM Tris/Cl pH 8, 5 mM $MgCl_2$, 20 µM APS, 0,2 mM ATP, 40 µM 3'5'PAP wenn angegeben

Die Umsatzrate der Sulfotransferase sank ab, wenn das Ammoniumsulfat-gefällte Protein an einem Molekularsieb (Sephacryl S 200) weiter getrennt wurde. Im Vergleich dazu stieg die Rate der APS-Kinase auf 500% an bzw. auf 600% im Ansatz mit 3'5'PAP. Von Hodson war ein stimulierender Effekt von PAP auf die nachweisbare Menge von PAPS in Chlorella-Extrakten beschrieben worden (Hodson et al 1968). Da dieser Effekt vermutlich in einer Einschränkung der Hydrolyse des gebildeten PAPS durch andere Enzyme begründet liegt, wurde untersucht, ob durch Zusatz von PAP zum Reaktionsansatz die Aktivität der APS-Kinase bzw. die nachweisbare Menge

an PAPS gesteigert werden konnte.

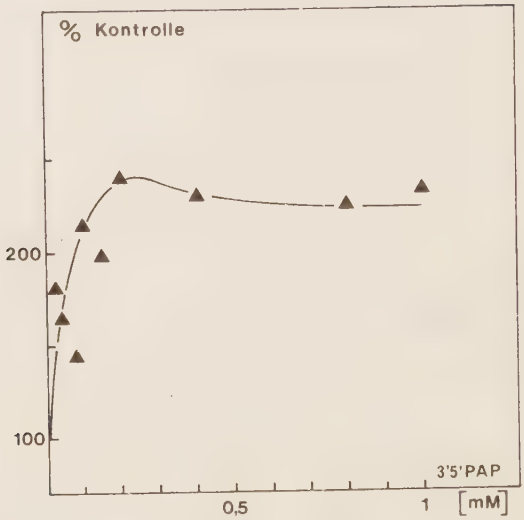


Abb. 4: Abhängigkeit der Umsatzrate der APS-Kinase von 3'5'PAP

Die Ansätze enthielten 25 mM Tris/Cl pH 8, 5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM ATP, 24 µM ^{35}S-APS, 8 mM Na_2SO_3; Inkub. 7 Min. bei 30 °C

Durch die Zugabe von 0,2 mM PAP konnte die Umsatzrate der APS-Kinase bis auf 250% gesteigert werden (Abb. 4). Bei weiterer Steigerung der PAP-Konzentration erreichte die Rate ein Plateau.

2.2.2. APS-Kinase-Aktivität in höheren Pflanzen

Entsprechend dem erarbeiteten Aufarbeitungsgang in Kap. 2.2.1. wurde versucht, APS-Kinase-Aktivität in höheren Pflanzen nachzuweisen. Dazu wurden Zellkulturen von Catharanthus roseus, Nicotiana tabacum und Ruta spec. näher untersucht, da bisher nur Daten über Untersuchungen an intakten Pflanzen vorlagen (Mercer und Thomas 1969, Burnell und Anderson 1973, Stanley et al 1975).

Weder in Rohextrakten noch nach Gelfiltration oder Chromatofokussierung konnte jedoch eine APS-abhängige Biosynthese von PAPS nachgewiesen werden. Das Fehlen von PAPS als Reaktionsprodukt der APS-Kinase in den Aufschlüssen der Zellkulturen wurde vermutlich durch die im Vergleich zu isolierten Chloroplasten (Burnell und Anderson 1973) erhöhte Aktivität an 3'Nukleotidase und Sulfhydrolase verursacht. Daneben kann nicht ausgeschlossen werden, daß das gebildete PAPS eventuell zu Sulfit oder Cystein weiter umgesetzt wurde. Allerdings konnte PAP als Reaktionsprodukt solcher Umsetzungen von PAPS in den Versuchen nicht nachgewiesen werden.

2.2.3. APS-Kinase-Aktivität in Bakterien

Für phototrophe Bakterien wurde von verschiedenen Autoren die Biosynthese von PAPS sowohl bei Rhodospirillaceen (Ibanez und Lindstrom 1959, 1962; Cooper und Trüper, unveröff.) als auch bei Chromatiaceen (Hoppe,unveröff.) beschrieben. In den eigenen Versuchen konnten diese Beobachtungen bestätigt werden und das Vorhandensein von APS-Kinase konnte in Chromatium vinosum und Rhodopseudomonas sulfidophila eindeutig gezeigt werden. Aus beiden Organismen konnte das Enzym teilweise gereinigt werden und nach Gelchromatographie im S300-Eluat nachgewiesen werden.

Für das Enzym aus Rps. sulfidophila wurden die app. K_M-Werte für APS und ATP bestimmt. In Abb. 5a sind die Messungen der Anfangsraten mit APS als variablen Substrat dargestellt. Dabei zeigte sich, daß bei den gewählten APS-Konzentrationen APS im Bereich größer 15 µM hemmend auf die Aktivität wirkte. Dieser Effekt steht im Einklang mit Untersuchungen an teilweise gereinigter APS-Kinase aus Chlamydomonas reinhardtii (Schwenn und Jender 1981). Aus der doppelt-reziproken Auftragung (Abb. 5b) ließ sich ein K_S für APS von 4 µM ermitteln. Der intercept-replot (Abb. 5c) ergab einen K_M-Wert für ATP von 10 µM.

Eine weitergehende Reinigung des Enzyms gemäß der in Kap. 2.3. beschribenen Methode war nicht erfolgreich, da nach der Chromato-

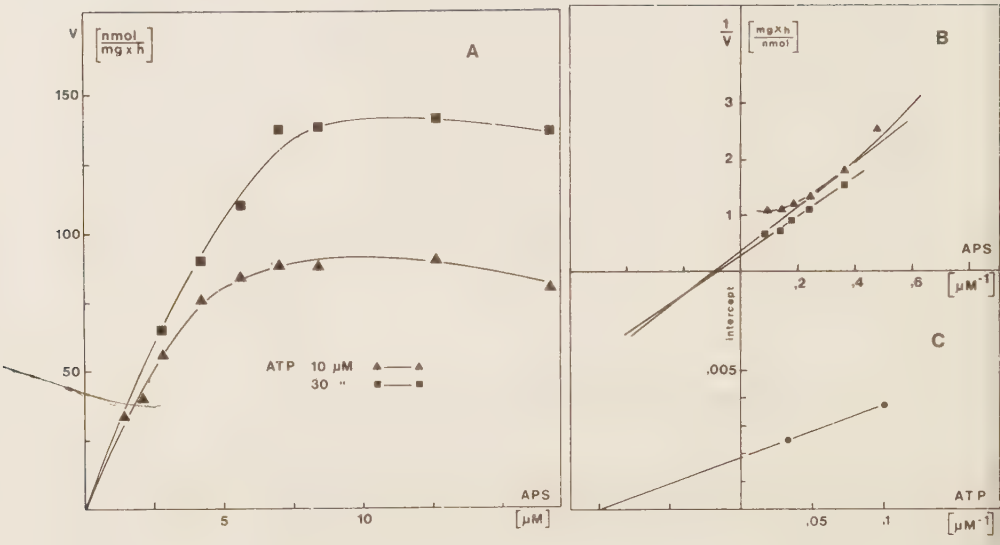


Abb.5: Abhängigkeit der APS-Kinase-Aktivität in Rps. sulfidophila von APS als variablen Substrat

Die Ansätze enthielten 25 mM Imidazol/Cl pH 6.8, 1 mM $MgCl_2$, 8 mM Na_2SO_3, ATP und ^{35}S-APS wie angegeben; Inkubation 3 Minuten bei 30 °C

fokussierung die Aktivität des Enzyms verloren ging. Eine Rekonstitution der enzymatischen Aktivität ließ sich auch nicht durch die Rekombination verschiedener Fraktionen erzielen.

2.3. Reinigung der APS-Kinase aus C. reinhardtii CW 15

Wie die Untersuchungen an verschiedenen Organismen (Kap. 2.2.) gezeigt haben, war das Enzym durch relativ einfache Aufarbeitungsmethoden in phototrophen Bakterien und Grünalgen zugänglich, jedoch nicht in höheren Pflanzen. Da das Algenenzym außerdem besonders stabil in den verwendeten Puffern war und auch keine grossen Aktivitätsverluste bei längerer Lagerung zeigte, wurde die APS-Kinase aus der einzelligen Grünalge Chlamydomonas reinhardtii isoliert und angereichert.

2.3.1. Rohextrakt und Ammoniumsulfat-Fällung

60-70 g Zellen wurden (wie in Methoden beschrieben) mit Ultraschall aufgeschlossen und das Enzym in Lösung gebracht. Das Sonicat wurde zur Entfernung feinerer Partikel 30 Minuten bei 45.000 x g zentrifugiert und der Überstand, der die löslichen Zellproteine enthielt, wurde einer fraktionierten Ammoniumsulfat-Fällung unterworfen. APS-Kinase wurde dabei in der Fraktion von 30-60% AS-Sättigung erhalten.

2.3.2. Gelchromatographie

Wie die Vorversuche (Kap. 2.2.1.) ergaben, konnte durch die Verwendung eines Molekularsiebes mit einem Fraktionierungsbereich von 20.000 bis 250.000 keine Trennung der Aktivitäten von APS-Kinase und APS-Sulfotransferase erzielt werden. Es war daher notwendig, für die weitere Reinigung des Rohextraktes ein Molekularsieb mit einem besseren Fraktionierungsbereich zu benutzen. Deshalb wurde nach dem Abzentrifugieren das Pellet der Ammoniumsulfat-Fällung in 50 mM Tris/Cl pH 8.0, 10 mM ß-MSH aufgenommen und an Sephacryl S 300 chromatographiert. Abb. 6 zeigt das Elutionsdiagramm und die Verteilung der Aktivität der APS-Kinase.

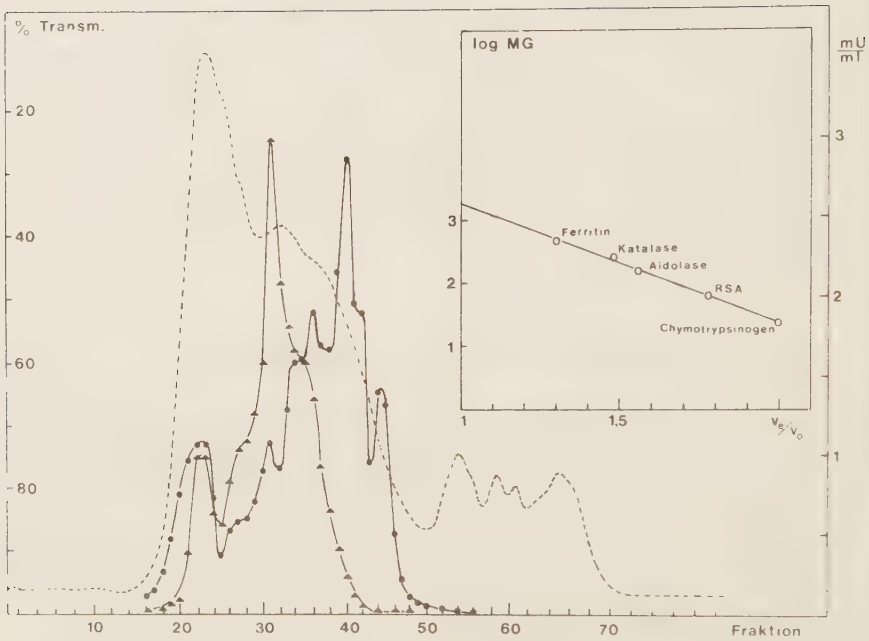


Abb. 6: Gelchromatographie eines Rohextraktes an Sephacryl S 300
Säule 2,5 x 60 cm; Elution 50 mM Tris/Cl pH 8.0,10 mM ß-MSH
Flußrate 0,5 ml/min, Fraktionen à 3,8 ml
---- Transmission, ●—● APS-Kinase, ▲—▲ APS-Sulfotransf.

Der Hauptanteil der APS-Kinase konnte im Bereich von 145-175 ml Elutionsvolumen eluiert werden. Diese Fraktionen wurden vereinigt und für die weitere Reinigung verwendet, da in ihnen nur geringe APS-Sulfotransferase-Aktivität vorhanden war. Für diese APS-Kinase konnte ein app. Molekulargewicht von 45.000 dalton ermittelt werden.

Im Bereich zwischen Fraktion 24 und 38 zeigten sowohl APS-Kinase als auch APS-Sulfotransferase kleinere Aktivitätsmaxima in Fraktion 28 und 34. Die Hauptaktivität der APS-Sulfotransferase lag in Fraktion 31, wobei auch hier gleichzeitig APS-Kinase nachweisbar war (näheres siehe Kap. 2.5.).

2.3.3. Chromatofokussierung

Verschiedene Versuche, das Enzym durch Ionenaustausch-Chromatographie weiter zu reinigen, waren nicht erfolgreich. Zwar konnte nach Trennung des S 300-Eluats an DEAE-Sephacel noch APS-Kinase nachgewiesen werden (125-150 mM KCl), jedoch ging die Aktivität innerhalb weniger Stunden verloren. Als weitaus schonender erwies sich eine weitere Trennung aufgrund der unterschiedlichen pI-Werte der Proteine (s. Methoden).

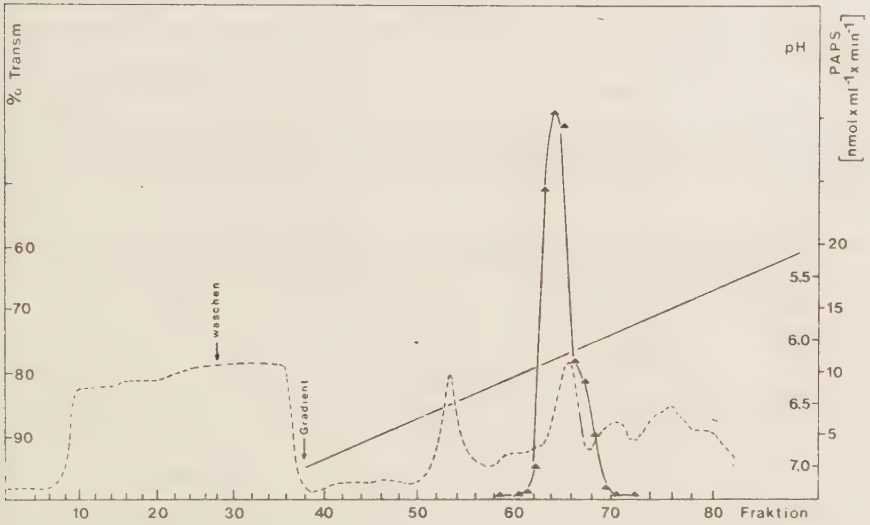


Abb. 7: Chromatofokussierung des S300-Eluats an PBE^{TM} 94
Säule 1 x 50 cm; Elution linearer Gradient pH 7-4 mit PB 74 (Fa. Pharmacia); Flußrate 0,2 ml/min
---- Transmission, ▲—▲ APS-Kinase-Aktivität

Abb. 7 zeigt das Elutionsprofil einer Trennung des S300-Eluats an einem Polybuffer-exchanger. Die Chromatofokussierung wurde durchgeführt mit einem linearen Gradienten von pH 7-4 mit Polybuffer^{TM} 74. Die APS-Kinase-Aktivität wurde als scharfer Peak bei einem pI von 6,2 pH-Einheiten eluiert. Dieser Schritt ergab eine 10-fache Anreicherung. Das soweit gereinigte Enzym enthielt kei-

nerlei APS-Sulfotransferase-Aktivität mehr und wurde für den Großteil der im weiteren beschriebenen Versuche verwendet.

2.3.4. Affinitätschromatographie

Eine weitergehende Reinigung des Enzyms konnte durch die Verwendung von Affinitätsgelen erreicht werden. Von den untersuchten immobilisierten Substanzen erwies sich N^6-gebundenes 2'5'ADP über C_6-Spacer an Agarose am geeignetsten für die weitere Trennung des Proteingemisches. Die aktivsten Fraktionen nach der Chromatofokussierung wurden vereinigt und im Batch über Nacht an das Gel adsorbiert. Da bekannt war, daß die APS-Kinase eine sehr hohe Affinität zu ihren Substraten zeigt (Kap. 2.2.), wurde die Elution mit einem linearen Gradienten von 0-500 µM ATP und 0-20 µM APS durchgeführt.

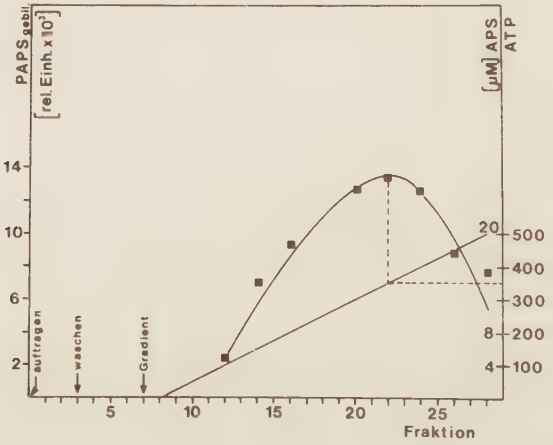


Abb. 8: Chromatographie von APS-Kinase an 2'5'ADP-Agarose

Säule 1 x 5 cm; Elution linearer Gradient 0-500 µM ATP und 0-20 µM APS in 25 mM Tris pH 8.0; Flußrate 0,15 ml/min

Das Maximum der Aktivität wurde bei einer Konzentration von 350 µM ATP und 14 µM APS eluiert. Dieser Schritt ergab nochmals eine ca. 3,5-fache Anreicherung des Enzyms.

2.3.5. Kontrolle der Reinheit

Während der gesamten Aufarbeitung wurde der Grad der Reinheit durch SDS-Elektrophorese kontrolliert. Abb. 9a,b zeigt ein SDS-Gel nach Coomassie-Blue-Färbung und das entsprechende Densitogramm für das hochgereinigte Enzym nach Affinitätschromatographie. Nach diesem letzten Schritt war das Enzym auf dem Gel als Doppelbande vorhanden. Mit geeigneten Eichproteinen wird für die erste ein app. Molekulargewicht von 45.000 dalton, für die zweite ein app. Molekulargewicht von 43.000 dalton erhalten (Abb. 10).

2.3.6. Zusammenfassung

Ein zusammenfassender Überblick über den Gang der Reinigung und die erzielte Anreicherung ist in Tab. 3 dargestellt.

REINIGUNGS-SCHRITT	VOLUMEN [ml]	EINH./ml	GES.-EINH. [mU]	SPEZ. AKT. [mU/mg]	AUSB. %	ANREICHERUNG
SONICAT	340	6,1	2074	0,25	100	1
AMMONIUMSULFAT-FÄLLUNG 30-60%	42	33,1	1389	1,07	68	4,3
SEPHACRYL S300	156	6,5	1014	4,20	50	16,8
CHROMATOFOKUSS.	44	14,1	620	39,2	31	156,8
AFFINITÄTSCHR. 2'5'-ADP-AGAROSE	20	3,0	60	135,6	3	542,4

Tab. 3: Reinigung der APS-Kinase aus C.reinhardtii

APS-Kinase konnte unter Verwendung von Gelchromatographie, Chromatofokussierung und Affinitätschromatographie ca. 550-fach aus der einzelligen Grünalge Chlamydomonas reinhardtii angereichert werden. Die Kontrolle durch SDS-Gelelektrophorese zeigte,

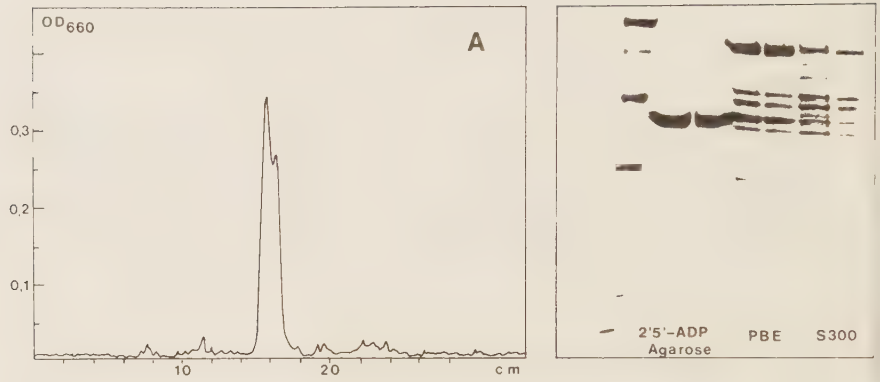


Abb. 9: SDS-Gelelektrophorese von APS-Kinase

A- Densitogramm des gereinigten Enzyms nach Chromatographie an 2'5'ADP-Agarose

B- SDS-Gele nach Coomassie-Blue-Färbung für verschiedene Reinigungsstufen

Durchführung siehe Methoden

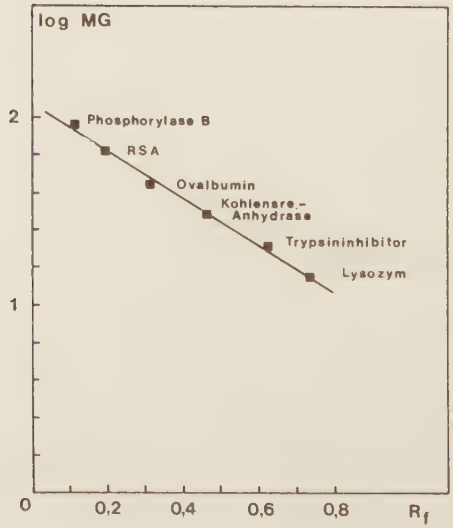


Abb. 10: Kalibrierungsgerade für SDS-Gele

daß bei der Reinigung nur noch eine Doppelbande nach der abschließenden Affinitätschromatographie auf dem Gel vorhanden war. Die Ausbeute war mit 3% gering. Eine besonders einfache aber effiziente Reinigung konnte durch die Verwendung der Chromatofokussierung erreicht werden. Die dabei erzielte Anreicherung von ca. 160-fach erlaubte es, routinemäßig eine relativ hoch gereinigte Enzympräparation mit gut reproduzierbaren Ergebnissen zu erhalten.

2.4. Molekulare und kinetische Eigenschaften

2.4.1. Kinetik der APS-Kinase-Reaktion

Die Abhängigkeit der APS-Kinase-Aktivität von der Proteinkonzentration war linear im Bereich von 0 bis 30 µg Protein/Ansatz (Abb. 11), wenn beide Substrate in sättigenden Konzentrationen vorhanden waren.

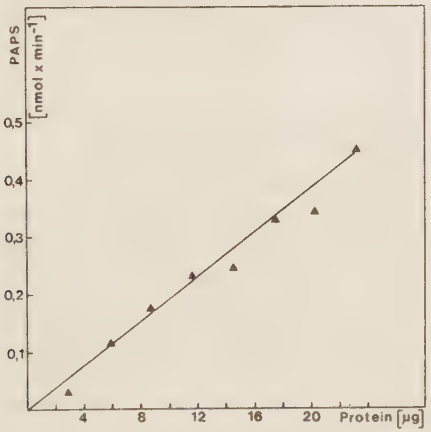


Abb. 11: Abhängigkeit der APS-Kinase-Aktivität von der Menge an eingesetztem Protein

Die Ansätze enthielten 25 mM Imidazol/Cl pH 6.8, 2 mM $MgCl_2$, 1o µM ^{35}S-APS, 30 µM ATP, 8 mM Na_2SO_3 und Protein wie angegeb. Inkubation 2 Minuten bei 30 °C.

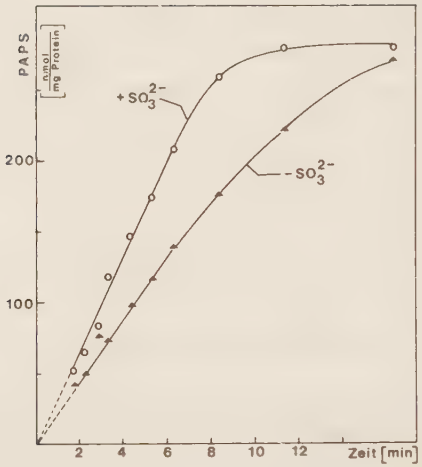


Abb. 12: Kinetik der APS-Kinase-Reaktion in An- und Abwesenheit eines Reduktionsmittels

Die Ansätze enthielten 25 mM Imidazol/Cl pH 6.8, 2 mM $MgCl_2$, 8 mM Na_2SO_3, 200 µM ATP, 26 µM ^{35}S-APS Inkubation wie angegeben bei 30 °C

In Gegenwart eines Reduktionsmittels (Na_2SO_3) verlief die Biosynthese von PAPS aus APS und ATP über einen Zeitraum von 8 Minuten linear, während in Abwesenheit von Sulfit eine geringere Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wurde, die nach 6 Minuten langsam abnahm (Abb. 12). In beiden Fällen war die absolut gebildete Menge an PAPS jedoch nach 18-20 Minuten gleich. Zum Verhalten gegenüber Sulfit und Thiolen siehe auch Kap. 2.4.7.

2.4.2. pH-Optimum und Ionenbedürfnis

Die bisherigen Untersuchungen zum pH-Optimum der Sulfataktivierung bezogen sich zumeist auf das gekoppelte System ATP-Sulfurylase/APS-Kinase (Burnell und Anderson 1973, Varma und Nicholas 1971). Lediglich für das System aus Hefe wurde das Optimum

für das isolierte Enzym mit pH 8.5 bestimmt (Robbins 1962). Die Abb. 13 zeigt, daß die optimalen Bedingungen für die Biosynthese von PAPS durch die APS-Kinase in vitro stark vom pH-Wert und dem verwendeten Puffersystem abhängig waren.

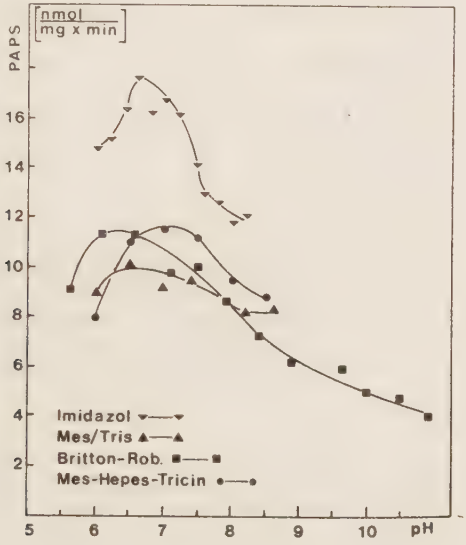


Abb. 13: Abhängigkeit der APS-Kinase-Aktivität vom pH-Wert und dem verwendeten Puffersystem

Die Ansätze enthielten 25 mM Puffer wie angegeben, 2 mM $MgCl_2$, 200 µM ATP, 28 µM ^{35}S-APS, 8 mM Na_2SO_3; Inkubation 7 Minuten bei 30 °C

Von den getesteten Puffern erwies sich Imidazol als sehr gut geeignet, während nicht-ionische Systeme und ein Puffer nach Britton-Robinson die Aktivität weniger stark unterstützten. Höhere Raten als Imidazol ergaben sich nur noch bei Verwendung von Phosphatpuffer (Tab. 4). Das pH-Optimum der APS-Kinase-Aktivität lag im Bereich von pH 6.5 bis 6.8 und damit nur etwas höher als der app. pI-Wert des Enzyms, wie er durch Chromatofokussierung bestimmt worden war (Kap. 2.3.3.).

Puffer	APS-Kinase-Aktivität [nmol/mg x min]
MES/Tris	9,9
MES/OH	10,3
HEPES/OH	9,2
Imidazol/Cl	12,3
Phosphat	13,9

Tab. 4: Abhängigkeit der Aktivität der APS-Kinase vom verwendeten Puffersystem

Die Ansätze enthielten 25 mM Puffer pH 6.8, 2 mM $MgCl_2$, 8 mM Na_2SO_3, 200 µM ATP, 25 µM ^{35}S-APS (spez. Akt. 10.000 cpm/nmol) und gereinigte APS-Kinase. Inkubation 7 Minuten bei 30 °C.

Die meisten Enzyme, die ATP als Substrat verwenden, benötigen Mg^{2+}-Ionen für maximale Aktivität, da ein $MgATP^{2-}$-Komplex das eigentliche Substrat darstellt. Für das Enzym aus Hefe wurde beschrieben, daß Mg^{2+} durch Mn^{2+} oder Co^{2+} ersetzt werden konnte (Robbins 1962).

Es zeigte sich auch in den eigenen Versuchen mit dem Enzym aus Chlamydomonas die erwartete Abhängigkeit von Mg^{2+}-Ionen (Tab. 5a). Daneben war auch Mn^{2+} als Cofaktor aktiv (90% der Kontrollrate), Co^{2+} und Cu^{2+} zeigten jedoch einen stark hemmenden Effekt auf die Aktivität (37% bzw. 10% der Kontrolle)(Tab. 5b).

Die Stimulierung durch Mg^{2+} war abhängig von der eingesetzten Menge an Substrat. Gemäß den Gleichgewichten

$$Mg^{2+} + ATP^{4-} \rightleftharpoons MgATP^{2-}$$

$$MgATP^{2-} + Mg^{2+} \rightleftharpoons Mg_2ATP^{\circ}$$

durchläuft die Aktivierung ein Optimum, d.h. maximale Aktivität wird erreicht, wenn alles Substrat als Mg^{2+}-Komplex vorliegt. Wird die Mg^{2+}-Konzentration weiter erhöht, so wird das ATP voll-

Zusatz	Aktivität [%]
kein $MgCl_2$	100
0,5 mM Mg^{2+}	187
1,0 mM Mg^{2+}	192
3,0 mM Mg^{2+}	153
kein Mg^{2+} + 2 mM EDTA	25
1,0 mM Mg^{2+} + 2 mM EDTA	108

Tab. 5a

Zusatz	Aktivität [%]
$MgCl_2$	100
$MnCl_2$	90
$CuCl_2$	10
$Co(NO_3)_2$	37

Tab. 5b

Zusatz	Aktivität [%]
kein Zusatz	100
NaCl	120
KCl	160
$NaNO_3$	145
Na-Asc.	126
KNO_3	127

Tab. 5c

Tab. 5: Ionenbedürfnis der APS-Kinase-Reaktion

Tab. 5a: Ansätze wie Tab.4 $MgCl_2$ wie angegeben

Tab. 5b: Ansätze wie Tab.4 $MgCl_2$ ersetzt durch 2 mM Me^{II}-Ionen

Tab. 5c: Ansätze wie Tab.4 zusätzlich 10 mM der angegebenen Zusätze

ständig komplexiert und der resultierende Mg_2ATP^0-Komplex ist katalytisch inaktiv (Tab. 5a). Auffallend ist, daß auch in einem Ansatz ohne Mg^{2+}-Zusatz (100%-Kontrolle) APS-Kinase-Aktivität gemessen werden konnte und diese Nullrate durch Zusatz von EDTA zwar gesenkt, aber nicht gänzlich ausgeschaltet werden konnte. Da die verwendeten Reagenzien Mg^{2+}-frei waren, könnte dieses Verhalten auf das Vorhandensein von intramolekular gebundenem Mg^{2+} hinweisen, wie es z.B. von Miller für die Adenosinkinase beschrieben worden ist (Miller et al 1979).

Für die Pyruvatkinase ist bekannt, daß sie für maximale Aktivität monovalente Ionen wie Na^+ und K^+ benötigt. Wie aus Tab. 5c hervorgeht, zeigte lediglich K^+ eine nennenswerte Stimulierung (60%), während die Na-Salze nur wenig Einfluß zeigten.

2.4.3. Kinetische Untersuchung der enzymatischen Aktivität

APS-Kinase katalysiert eine Zweisubstrat-Zweiprodukt-Reaktion (BiBi), wobei es sich bei beiden Substraten um Adenosinnukleotide handelt. Der Ablauf einer solchen Reaktion kann auf verschiedene Art und Weise erfolgen (näheres Kap. 3.3., S. 69 ff., sowie Segel 1975, Dixon und Webb 1979, Boyer 1970).

Der Mechanismus der Enzymkatalyse kann durch die Substratbindungskonstanten näher beschrieben werden. Weitere Aufschlüsse über den Mechanismus sowie über die Reihenfolge der Substratbindung an das Enzym und die Reihenfolge der Freisetzung der Produkte können durch Messungen der Aktivität in Gegenwart der Produkte erhalten werden. Die Enzymrate wurde daher bei verschiedenen Konzentrationen der Substrate APS und ATP (Kap. 2.4.3., 2.4.4.) sowie in Gegenwart von ADP, PAPS und Analoga (Kap. 2.4.5.) gemessen.

Wenn die Anfangsraten der APS-Kinase-Aktivität abhängig von APS bei verschiedenen konstanten ATP-Konzentrationen aufgenommen wurden, ergaben sich die in Abb. 14a-c dargestellten Kurven. Die doppelt-reziproke Auftragung ergab nahezu parallele Geraden (Abb. 14b) und erst die Darstellung der Ergebnisse nach Hanes und Woolf führte zu einem gemeinsamen Schnittpunkt bei K_s = 1,5 µM (Abb. 14c). Bei den gewählten Konzentrationen an ATP (100 bis 300 µM) war über den gesamten Konzentrationsbereich keine Substrathemmung durch APS zu beobachten.

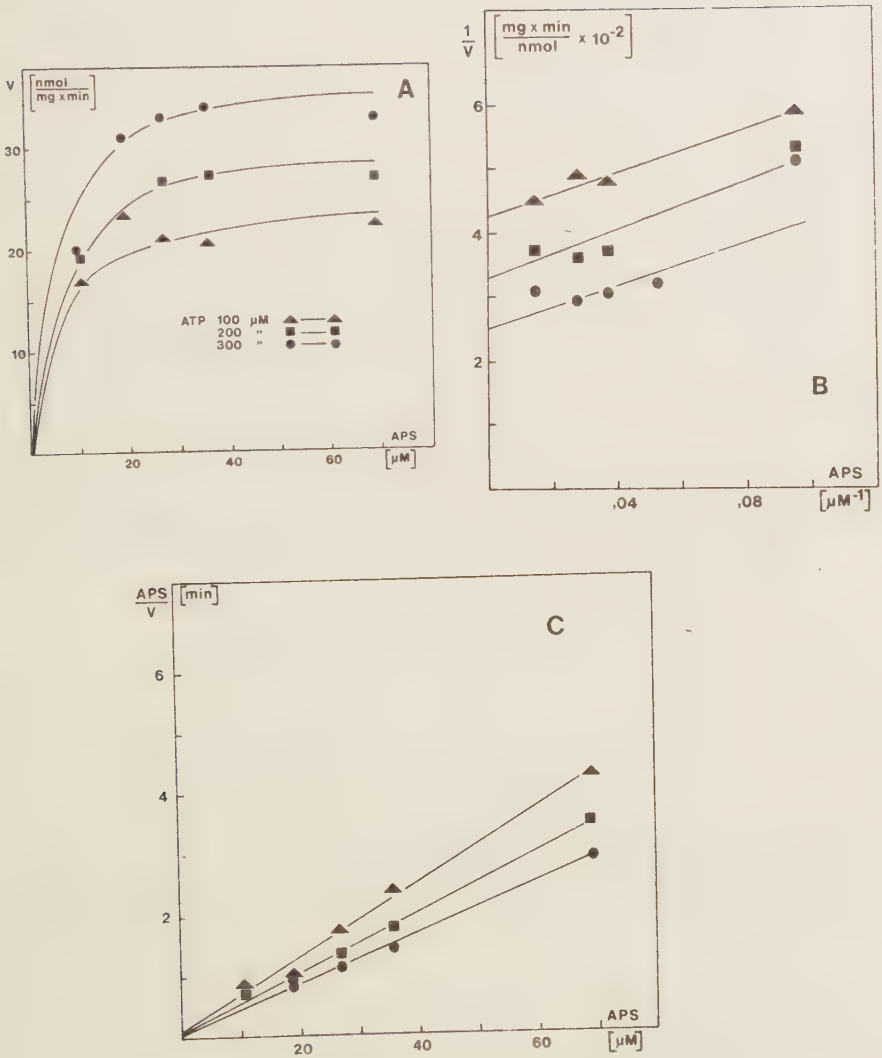


Abb. 14: Abhängigkeit der APS-Kinase-Reaktion von APS bei verschiedenen ATP-Konzentrationen

Die Ansätze enthielten 25 mM Imidazol/Cl pH 6.8, 2 mM $MgCl_2$, 8 mM Na_2SO_3, 22 µg Protein; Inkubation 7 Minuten bei 30 °C

Eine Bestimmung der Anfangsraten bei niedrigeren Substratkonzentrationen, d.h. bei solchen Konzentrationen, die im Bereich der K_s-Werte lagen und damit den tatsächlichen Bedingungen in vivo näher kamen, führte dagegen zu einem völlig anderen Verhalten des Enzyms. Die Reaktion folgte nicht mehr einer Michaelis-Menten-Kinetik, was sich in einem $S_{0,75}/S_{0,1}$-Wert von 4 bis 5 zeigte (Abb. 15a). Eine Auftragung der Ergebnisse aus Abb. 15a nach Lineweaver-Burk führte zu konkav verlaufenden Kurven (Abb. 15b). Bei den gewählten ATP-Konzentrationen von 20-50 µM wirkten sich APS-Konzentrationen größer als 10-12 µM hemmend auf die katalytische Aktivität aus, während die app. V_{max} mit höheren ATP-Konzentrationen stiegen. Im Bereich geringerer Substratkonzentrationen war festzustellen, daß mit steigenden APS-Konzentrationen der K_s für APS sank. Um ein genaueres Bild über das Verhalten bei niedrigen APS-Konzentrationen zu erhalten, wurden die Daten aus Abb. 15a ebenfalls nach Hanes-Woolf aufgetragen. Auch hierbei ergaben sich keine linearen Kurvenverläufe (Abb. 15c). Insbesondere auch bei APS-Konzentrationen kleiner als 6 µM verliefen die Kurven nicht linear sondern konkav.

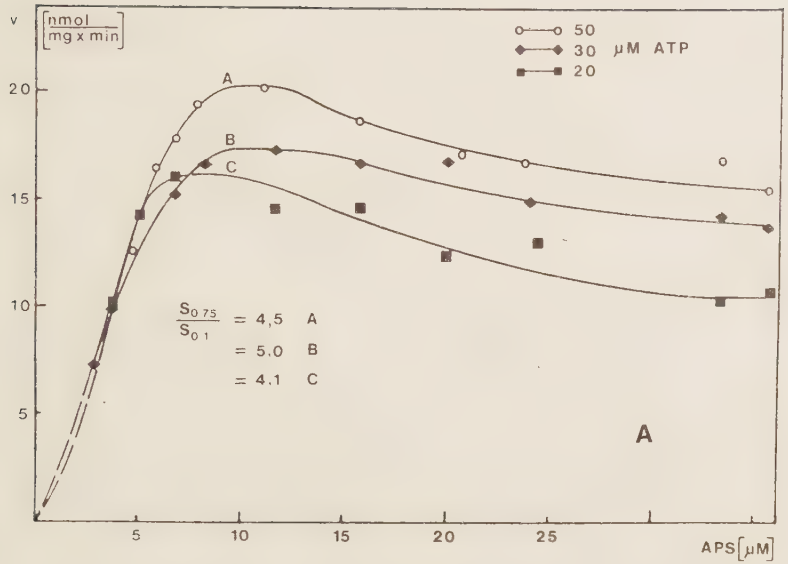
Unter Berücksichtigung der Gleichung

$$\frac{[A]}{v} = \frac{1 + \frac{K_b}{[B]}}{V_{max}} A + \frac{K_a}{Vmax} \left(1 + \frac{K_a K_b}{K_a [B]}\right)$$

ergab der slope-replot aus dem S-Achsen-Schnittpunkt einen K_M für ATP von 10 µM und der intercept-replot aus dem S-Achsen-Abschnitt gemäß

$$\frac{K_a}{K_a K_b} = 0{,}012\ \mu M^{-1}$$

einen K_M für APS von 0,2 µM. Das Abweichen der Kurven in Abb. 15 von der eigentlich erwarteten Linearität ließ auf eine kooperative Abhängigkeit der Anfangsraten von der APS-Konzentration schliessen, was auch die Darstellung der Ergebnisse in einem v/S-Diagramm unterstrich (Abb. 15a).



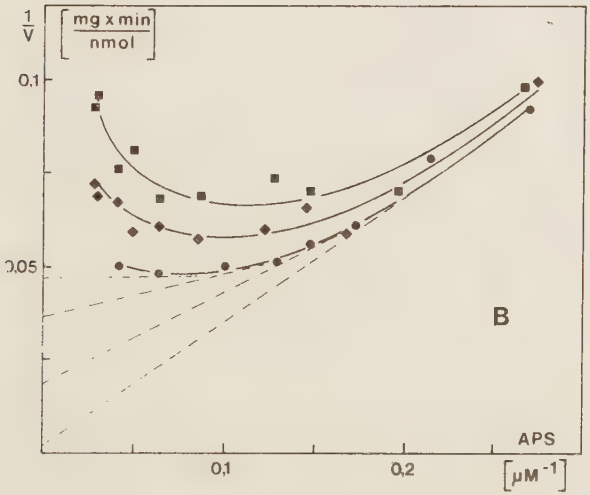


Abb. 15: Abhängigkeit der APS-Kinase-Reaktion von APS bei verschiedenen ATP-Konzentrationen

Ansätze siehe Abb. 14; Inkub. 3 Minuten, 30 °C

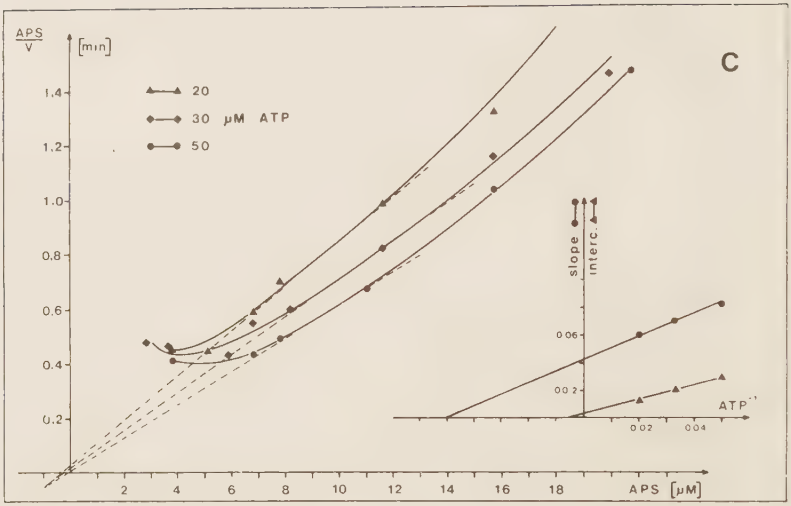


Abb. 15, Fortsetzung

Die im Vorhergehenden erläuterten Ergebnisse wurden bestätigt, wenn ATP das variable Substrat war. Auch hierbei ergaben sich bei relativ hohen Substratkonzentrationen anscheinend parallel verlaufende Geraden in der doppelt-reziproken Auftragung (Abb. 16b), und erst die Hanes-Woolf-Darstellung führte zu einem gemeinsamen Schnittpunkt bei K_s= 8 µM (Abb. 16c).

Die aus der entsprechenden v/S-Auftragung ermittelten $S_{0,75}/S_{0,1}$ Werte von 5 bzw. 11 deuten ebenfalls darauf hin, daß die Reaktion keiner normalen Michaelis-Menten-Kinetik folgt.

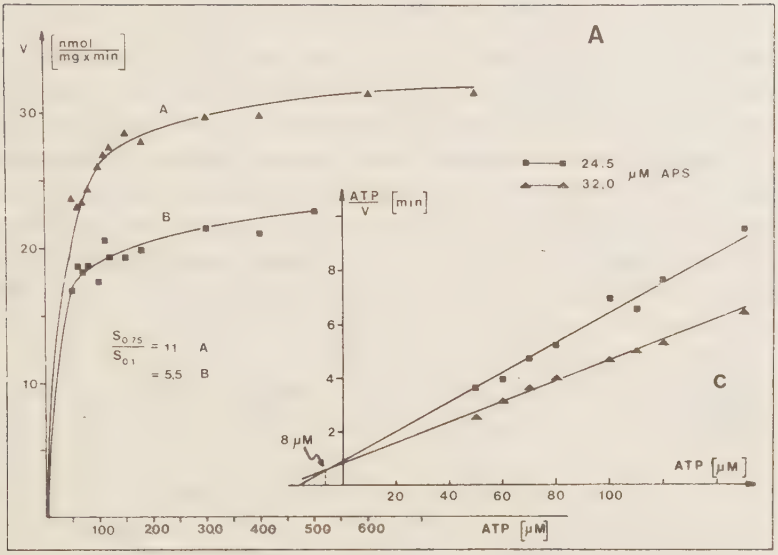
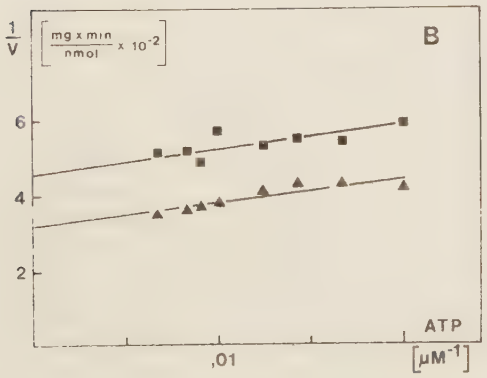


Abb. 16: Abhängigkeit der APS-Kinase-Reaktion von ATP bei verschiedenen APS-Konzentrationen

Versuchsbedingungen siehe Abb. 14



Diese Vermutung wurde unterstrichen, wenn man ebenfalls die Anfangsraten bei niedrigen Substratkonzentrationen bestimmte. Aus der Abb. 17 a ließ sich wiederum ein $S_{0,75}/S_{0,1}$-Wert von 11 ermitteln. Gleichzeitig zeigt der Kurvenverlauf im Bereich kleiner 5 µM ATP ein deutlich von der normalen Michaelis-Menten-Kinetik abweichendes Verhalten. Die doppelt-reziproke Auftragung liefert einen gemeinsamen Schnittpunkt bei K_s= 8 µM (Abb. 17b). Auch hier ergab sich bei einem entsprechend gewählten Abbildungsmaßstab ein leicht konkaver Verlauf, der aber verglichen mit den Ergebnissen für APS als variiertes Substrat sehr gering ausgeprägt war (Abb. 17c).

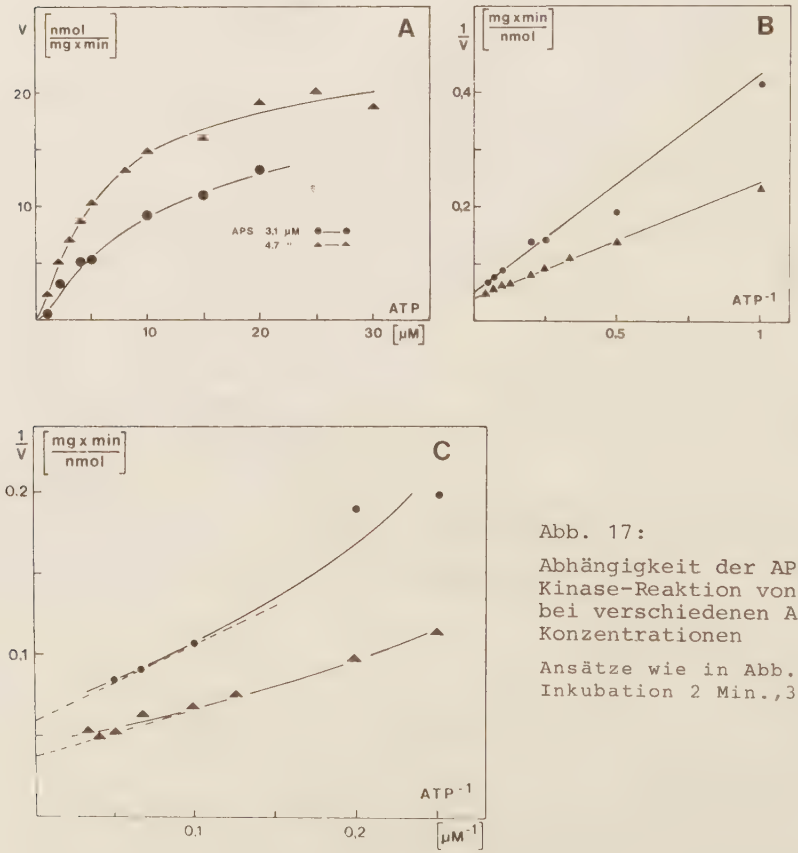


Abb. 17:

Abhängigkeit der APS-Kinase-Reaktion von ATP bei verschiedenen APS-Konzentrationen

Ansätze wie in Abb. 14
Inkubation 2 Min.,30 °C

2.4.4. Bindungsstellen für APS und ATP

Aus technischen Gründen war die Zahl der Messungen der Anfangsraten bei extrem niedrigen Substratkonzentrationen, d.h. im Bereich der K_s-Werte, sehr gering. Um einen sigmoiden Kurvenverlauf im v/S-Diagramm sicher nachzuweisen, hätten die Konzentrationen noch weiter gesenkt werden müssen. Dies hätte einerseits hochmarkiertes ^{35}S-APS erfordert, andererseits würden kleine experimentelle Fehler in diesem Bereich zu falschen K_s-Werten geführt haben. Es schien daher sinnvoller, die Bindungsstellen für APS und ATP und ihre mögliche Beeinflussung untereinander zu untersuchen. Dazu wurden die aus den Messungen der Anfangsraten gewonnenen Werte zum einen nach der Methode von Eadie und Scatchard aufgetragen, zum anderen konnte aus Auftragungen nach Hill die minimale Anzahl der Bindungsstellen ermittelt werden (mathematische Grundlagen bei Segel 1975).

Auftragungen von 1/v gegen 1/APS konnten linearisiert werden, wenn im Bereich geringer Umsatzraten n_{app} mindestens gleich 2 gesetzt wurde, bei höheren Raten mußte n_{app} gleich 4 sein.

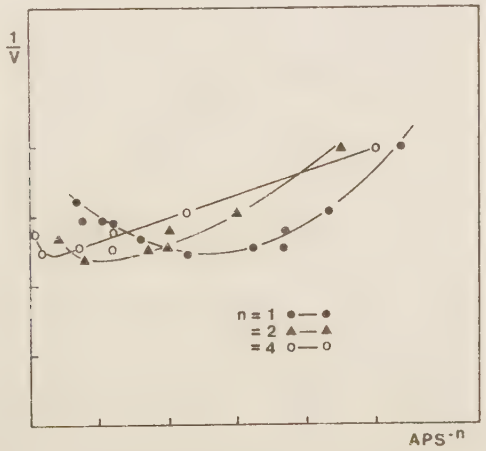


Abb. 18: Linearisierung der Lineweaver-Burk-plots durch Auftragung von 1/v gegen $1/S^n$

Daten aus Abb. 15b für ATP=20 µM

In Abb. 18 sind die doppelt-reziproken Auftragungen für die Kurve A aus Abb. 15a für steigende n_{app} dargestellt. Es wird deutlich, daß die Auftragungen im Bereich von 4.5-11 µM APS linear verlaufen wenn $n_{app} = 4$ und erst bei Konzentrationen größer als 11 µM die einsetzende Substrathemmung zu einer asymptotischen Näherung an die 1/v-Achse führt.

Trägt man die gewonnenen Ergebnisse der Anfangsraten-Messungen (Abb. 15a) nach Eadie-Scatchard auf

$$\frac{v'}{[S]} = -v \cdot [S]'^{n-1} + [S]'^{n-1}$$

wobei

$$v' = \frac{v}{V_{max}} \qquad \text{und} \qquad [S]'^{n} = \frac{[S]^n}{K'}$$

erhält man eine Anzahl kuppelförmig verlaufender Kurven (Abb. 19).

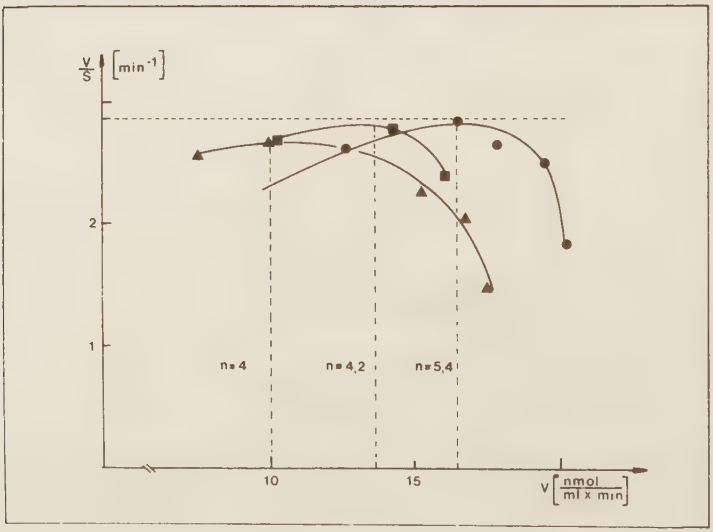


Abb. 19: Eadie-Scatchard-Auftragungen für die Messungen der Anfangsraten in Abb. 15

Mit steigenden ATP-Konzentrationen verschieben sich die Maxima zu höheren v'-Werten, obwohl die v'/S-Koordinate konstant bleibt. Gemäß der Gleichung

$$v' = \frac{n-1}{n} \cdot V_{max}$$

ergeben sich Werte für n_{app} zwischen 4 und 5,4. Der Wert von 5,4 wird weiterhin durch Hill-plots für APS bestätigt.

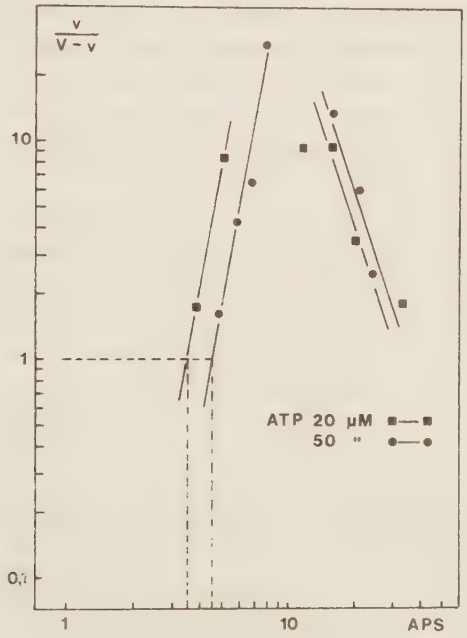


Abb. 20: Hill-plots für APS bei verschiedenen ATP-Konzentrationen

Berechnung aus den Daten der Abb. 15

Der Verlauf der Hill-plots war linear über einen Konzentrationsbereich bis 8 µM APS (Abb. 20). Die Substrathemmung durch höhere APS-Konzentrationen zeigte sich in den negativen Steigungen, die zu einem n_H' von 3 führten. Erhöhung der ATP-Konzentration ver-

größert $S_{0,5}$, d.h. die APS-Konzentration, die für halbmaximale Umsatzraten benötigt würden, wenn n=1 wäre.
Aus den Gleichungen

$$K' = [S]^n_{0,5}$$

$$K' = K_s^n \ (\ a^{n-1} \ b^{n-2} \ .....z^1 \ )$$

wird deutlich, daß die Steigerung der ATP-Konzentration entweder zu einer Veränderung des K_s-Wertes für APS führt oder die gegenseitige Beeinflussung der Bindungsstellen verändert (a,b, usw stellen die sog. Interaktionsfaktoren dar).

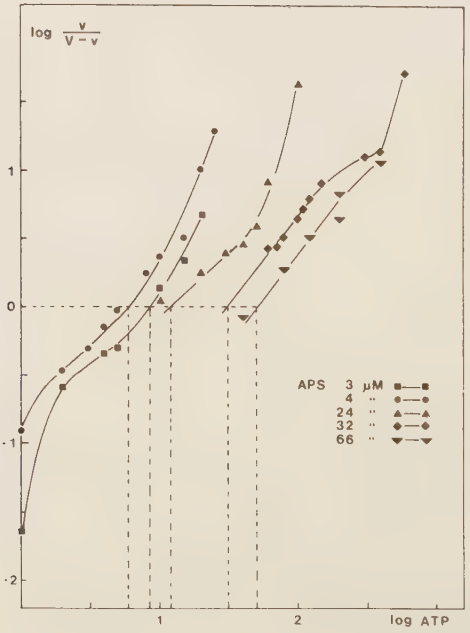


Abb. 21: Hill-plots für ATP bei verschiedenen APS-Konzentrationen

Berechnung aus den Daten der Abb. 16 und 17

Die Hill-plots für ATP ergaben im Gegensatz zu den entsprechenden Auftragungen für APS keine geradlinige Abhängigkeit über den gesamten Konzentrationsbereich (Abb. 21). Sowohl bei sehr geringen als auch bei höheren Konzentrationen ergab sich ein $n_H = 4$, wenn die eingesetzte APS-Konzentration kleiner 10 µM war. Im Bereich von 0,25 bis 1 K_S ergab sich ein Wert von $n_H = 1$. Untersuchungen in höheren Konzentrationsbereichen (APS > 10 µM, ATP > 40 µM) ergaben ein n_H von 1; $n_H = 4$ erhielt man wiederum für sehr hohe ATP-Konzentrationen. Da die Berechnung der Hill-plots von S_{total} ausging, könnten sich die höheren n_H-Werte bei niedrigen Konzentrationen dadurch ergeben, daß ein vergleichsweise hoher Anteil des Substrates Enzym-gebunden vorliegt (Segel 1975). Da steigende ATP-Konzentrationen einen negativen Einfluß auf den K' für APS hatten, wie oben gezeigt werden konnte, könnte ein intermediär geringeres n_H aber auch ein Hinweis auf negative Kooperativität sein.

Aus einem Vergleich der $S_{0,5}$-Werte bei sich ändernden APS-Konzentrationen wird deutlich, daß im Konzentrationsbereich unter 10 µM eine Erhöhung der APS-Konzentration zu einer Verringerung des K'-Wertes für ATP führte. Dieser positive Effekt auf die ATP-Bindung blieb aus, wenn APS-Konzentrationen größer 20 µM eingesetzt wurden, wobei sich die entsprechenden $S_{0,5}$-Werte zu stetig steigenden ATP-Konzentrationen verschoben.

2.4.5. Produkthemmung und Wirkung von Mononukleotiden

Die kinetischen Untersuchungen der Anfangsraten (Kap. 2.4.3.) sprechen für einen sequentiellen Mechanismus der APS-Kinase-Reaktion, d.h. erst nachdem beide Substrate an das Enzym gebunden haben, findet eine Umsetzung statt. Dabei kann die Reihenfolge der Substratbindung beliebig sein ("random") oder aber strikt festgelegt sein ("ordered"). Um die Frage zu klären, ob APS oder ATP als erstes gebunden werden oder ob diese Reihenfolge beliebig ist, sollten die Produkte der Reaktion, PAPS und ADP, auf ihren Einfluß auf die Reaktion untersucht werden. Darüberhinaus zeigte die APS-Kinase kooperative Eigenschaften hinsichtlich ihrer Substrate und es war daher nicht auszuschließen, daß auch die Produkte oder

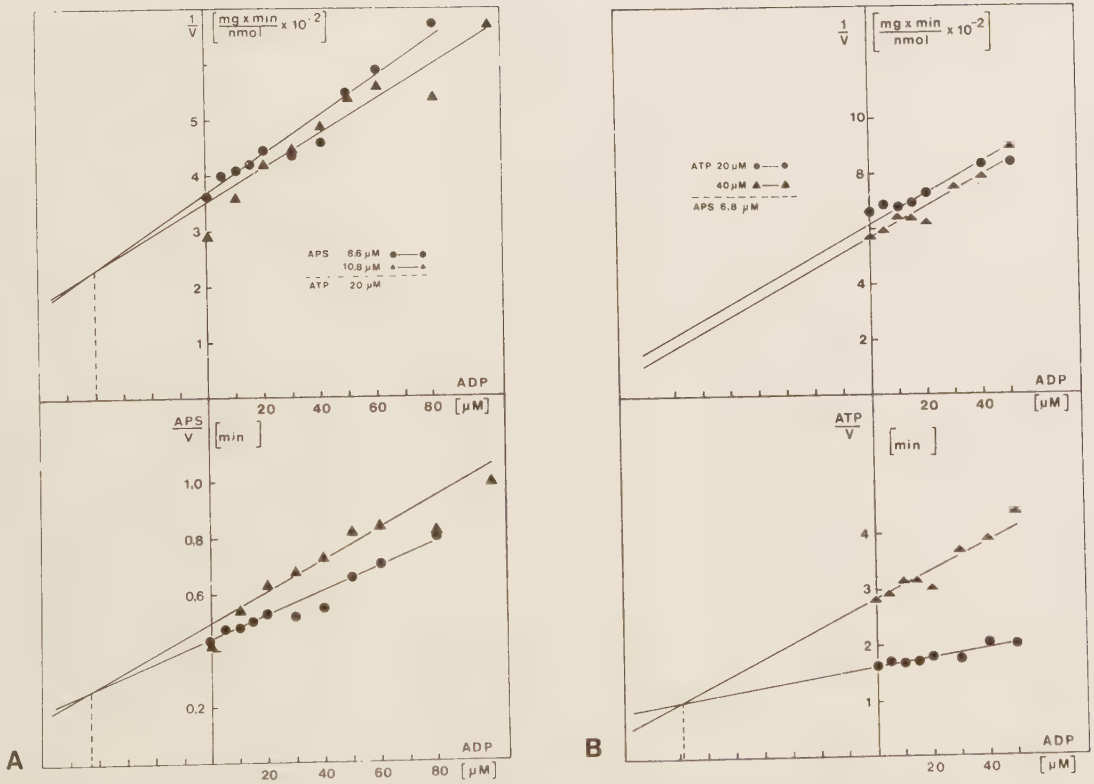


Abb. 22: Einfluß von ADP auf die Aktivität der APS-Kinase

Die Ansätze enthielten 25 mM Imidazol/Cl pH 6.8, 1 mM $MgCl_2$, 8 mM Na_2SO_3, ^{35}S-APS und ATP wie angegeben; ADP wie angegeben; Inkub. 3 Minuten, 30 °C

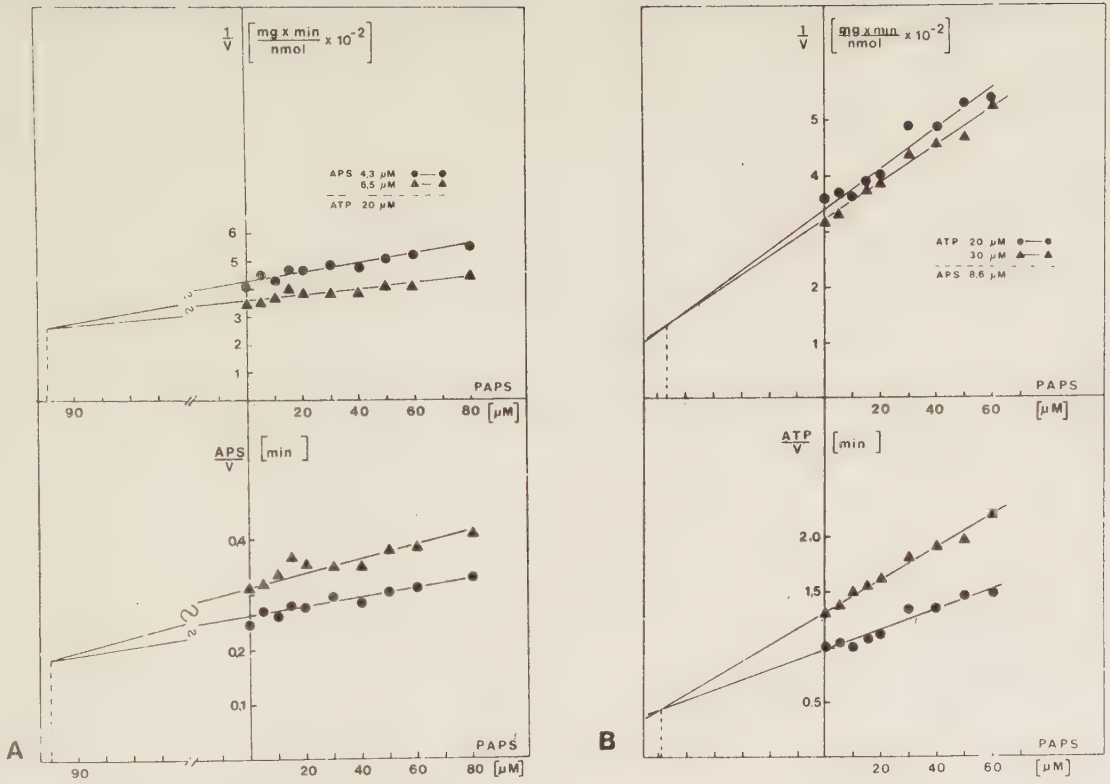


Abb. 23: Einfluß von PAPS auf die Aktivität der APS-Kinase

Reaktionsbedingungen siehe Abb. 22

analoge Adenylylverbindungen regulatorische Wirkungen zeigen würden.

Abb. 22a,b und 23a,b zeigen den Einfluß von ADP und PAPS auf die Aktivität der APS-Kinase. Es sind sowohl die Auftragungen nach Dixon (1/v gegen I) und Cornish-Bowden (S/v gegen I) dargestellt, um die Art der Hemmung eindeutig bestimmen zu können.

PAPS erwies sich mit einem app. K_i von 100 µM als vergleichsweise schlechter "mixed-type"-Inhibitor für die Bindung von APS an das Enzym. Im Gegensatz dazu wurde die Bindung von ATP deutlich beeinflußt und der app. K_i war mit 60 µM nur um den Faktor 5 größer als der K_s für ATP. Ähnlich wie PAPS war ADP ein "mixed-type"-Inhibitor der APS-Bindung. Der app. K_i deutet daraufhin, daß die Bindung von APS an das Enzym durch ADP weitaus effektiver gehemmt wurde als durch PAPS. Er war mit 45 µM jedoch immer noch sehr schlecht verglichen mit dem K_s für APS (1-2 µM). Die Bindung von ATP wurde durch ADP unkompetitiv gehemmt und zwar mit einem app. K_i von 70 µM. Beide Produkte, sowohl PAPS als auch ADP, ergaben den annähernd gleichen K_i für die ATP-Bindung und wären daher sehr gut geeignet, die Aktivität der APS-Kinase zu kontrollieren.

Die Mononukleotide 5'AMP und 3'AMP zeigten eine unterschiedliche Wirkung auf die APS-Bindung (Abb. 24a, Abb. 25). 5'AMP hemmte diese Bindung kompetitiv, wobei der app. K_i mit 45 µM genauso groß war wie der für ADP ermittelte. Das Verhalten von 3'AMP entsprach der Hemmung von PAPS, das ebenfalls eine 3'-Phosphatgruppe besitzt. Auch 3'AMP verursachte eine "mixed-type"-Inhibierung mit etwa dem gleichen app. K_i von 95 µM.

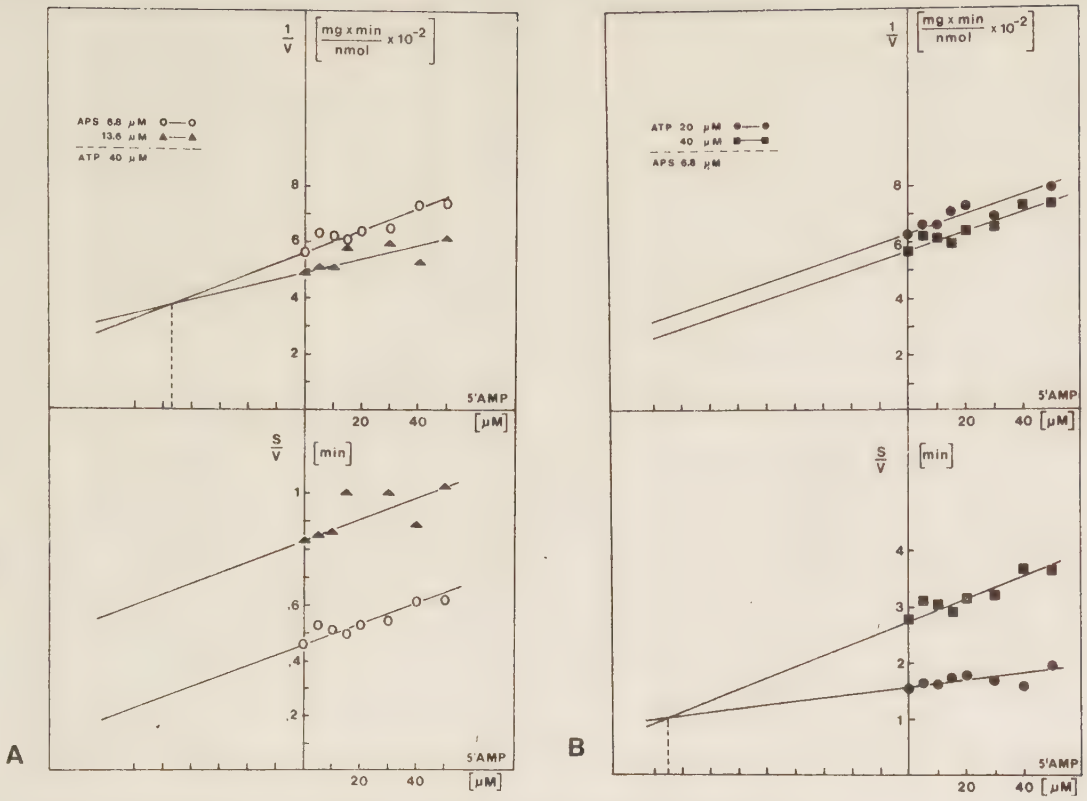


Abb. 24: Einfluß von 5'AMP auf die Aktivität der APS-Kinase

Reaktionsbedingungen siehe Abb. 22

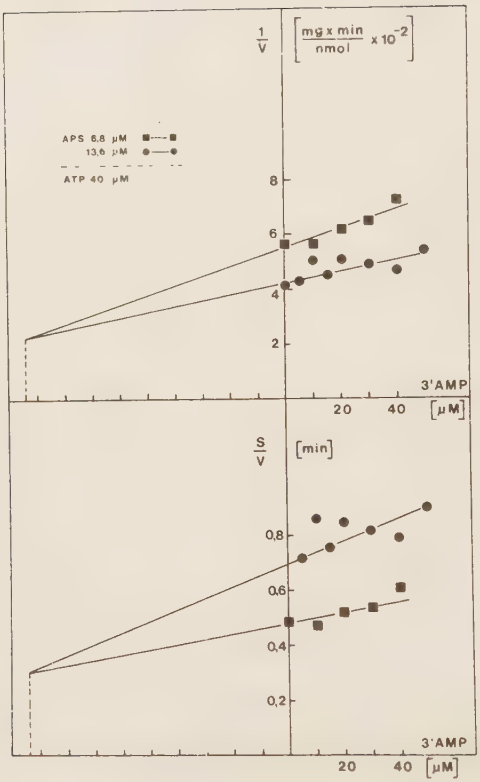


Abb. 25: Einfluß von 3'AMP auf die Aktivität der APS-Kinase

Reaktionsbedingungen s. Abb.2

Daraus ließe sich der Schluß herleiten, daß eine Phosphatgruppe in 3'Stellung der Ribose zum Erkennen eines "Nicht-Substrates" führt. Für 5'AMP wurde auch die Wirkung auf die ATP-Bindungsstelle untersucht (Abb. 24b). Die Hemmung entsprach der Wirkung von ADP und auch der app. K_i lag mit 85 µM in der gleichen Größenordnung wie der für ADP.

In Tab. 6 sind die Ergebnisse zur Hemmung der APS-Kinase durch Adenylylverbindungen noch einmal zusammenfassend dargestellt. Dabei zeigte sich, daß Adenosinnukleotide mit einer Phosphatgruppe in 3'Stellung der Ribose untereinander ein ähnliches Verhalten zeigen und hinsichtlich der APS-Bindung uneffektiver sind als 5'Nukleotide. Verglichen mit dem K_s für APS sind aber auch die app. K_i-Werte der 5'Nukleotide sehr hoch. Bei der Kompetition um

	APS		ATP	
	Hemmung	K_i	Hemmung	K_i
ADP	mixed-type	45 µM	unkompetitiv	70 µM
PAPS	mixed-type	100 µM	mixed-type	60 µM
5'AMP	kompetitiv	45 µM	unkompetitiv	85 µM
3'AMP	mixed-type	95 µM	nicht best.	--

Tab. 6: Einfluß von Adenylylverbindungen auf die Aktivität der APS-Kinase

die ATP-Bindungsstelle ergaben sowohl PAPS als auch ADP und 5'AMP app. K_i-Werte in einer annähernd gleichen Größenordnung.

Zusatz	Aktivität [%]
Kontrolle	100
5'AMP 100 µM	76
5'dAMP 100 µM	68,5
5'UMP 100 µM	72,5
5'IMP 100 µM	84,5
5'GMP 100 µM	75
5'CMP 100 µM	62
N^6-Methyl-5'AMP 100 µM	69,5
6-Mercapto-riboside5'P	70

Tab. 7: Einfluß von Mononukleotiden und Analoga auf die APS-Kinase-Reaktion

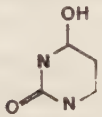
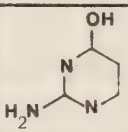
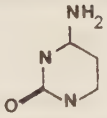
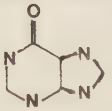
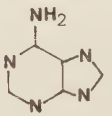
Die Ansätze enthielten 25 mM Imidazol/Cl pH 6.8, 1 mM $MgCl_2$, 8 mM Na_2SO_3, 4,7 µM ^{35}S-APS, 25 µM ATP, Inkubation 2 Min., 30 °C

Die übrigen Mononukleotide der verschiedenen Purin- und Pyrimidinbasen wurden nicht hinsichtlich der Art der Hemmung auf die beiden Substrate untersucht, sondern lediglich auf den Grad der Hemmung der Umsatzrate. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

Von den getesteten Nukleotiden erwiesen sich die Pyrimidin-Derivate als effektiver verglichen mit 5'AMP. Dabei war CMP mit 38% Hemmung der wirksamste Inhibitor der APS-Kinase-Aktivität. Das Fehlen einer Hydroxylgruppe in 2'Stellung der Ribose verbesserte aber auch die Wirkung der Purinderivate wie der Vergleich von 5'AMP und 2'Desoxy-5'AMP zeigt. Zu einer Steigerung der Hemmwirkung führte auch das Einführen einer Methylgruppe in N^6-Stellung des Purinringes.

2.4.6. Spezifität für Nukleosid-Triphosphate

Für die APS-Kinase aus Hefe wurde von Robbins und Lipman beschrieben, daß von den verschiedenen Nukleosid-triphosphaten sowohl ITP als auch GTP und UTP höhere Raten ergaben verglichen mit ATP, während CTP etwa gleich gut die Reaktion unterstützte (Robbins und Lipman 1958). Jedoch konnten die Autoren die Anwesenheit einer Nukleosid-diphosphat-kinase sowie Spuren von ADP

Nukleotid	Base	Zusatz	Aktivität [nmol/mgxmin]
UTP		5 µM 25 µM	3,4 8,2
GTP		5 µM 25 µM	4,0 8,4
CTP		5 µM 25 µM	8,6 18,3
ITP		5 µM 25 µM	3,6 8,3
ATP		5 µM 25 µM	12,2 21,6
dATP		5 µM 25 µM	12,0 20,4

Tab. 8: Spezifität der APS-Kinase für Nukleosid-triphosphate

Die Ansätze enthielten 25 mM Imidazol/Cl pH 6,8, 1 mM $MgCl_2$, 8 mM Na_2SO_3, 3,5 µM ^{35}S-APS; Inkub. 3 Min., 30°C

und ATP in den Präparationen nicht ausschließen. Um diese Aussagen mit der gereinigten APS-Kinase aus Chlamydomonas zu überprüfen, wurden die verschiedenen Nukleosid-triphosphate zunächst untereinander verglichen.

Die Ergebnisse (Tab. 8) mit dem Enzym aus Chlamydomonas stehen im Widerspruch zu den Versuchen von Robbins und Lipman. Während dATP annähernd gleiche Umsatzraten ergab wie ATP, war von den übrigen Nukleosid-triphosphaten lediglich CTP aktiv. UTP, GTP und ITP ergaben nur etwa 30% der Rate verglichen mit ATP. Ein Vergleich der Struktur der dazugehörigen Basen zeigt, daß hohe Aktivität von den Nukleotiden erreicht wurde, die in C6-Stellung der Base eine Aminogruppe besitzen. Das Fehlen der Hydroylfunktion in 2'Stellung der Ribose scheint im Gegensatz dazu für die Bindung an das Enzym nicht wichtig zu sein.

In Abb. 26 und 27 sind die Michaelis-Menten-Kinetiken und die dazu gehörigen doppelt-reziproken Auftragungen nach Lineweaver und Burk dargestellt.

Im Vergleich zu den Sättigungskurven für ATP (Kap. 2.4.3.) verlaufen die Michaelis-Menten-Kinetiken für CTP, GTP und UTP viel flacher und zeigen besonders für den Fall von GTP einen fast sigmoiden Verlauf (Abb. 26). Im Gegensatz dazu verläuft der Graph für dATP entsprechend der in Kap. 2.4.3. dargestellten Kinetiken für ATP. Die ermittelten $S_{0,75}/S_{0,1}$-Werte entsprechen mit 10-12 denen für ATP.

Bei den doppelt-reziproken Auftragungen (Abb. 27) fällt auf, daß man für dATP scheinbar parallel verlaufende Geraden erhält, während UTP, GTP und CTP wie erwartet einen gemeinsamen Schnittpunkt ergaben.

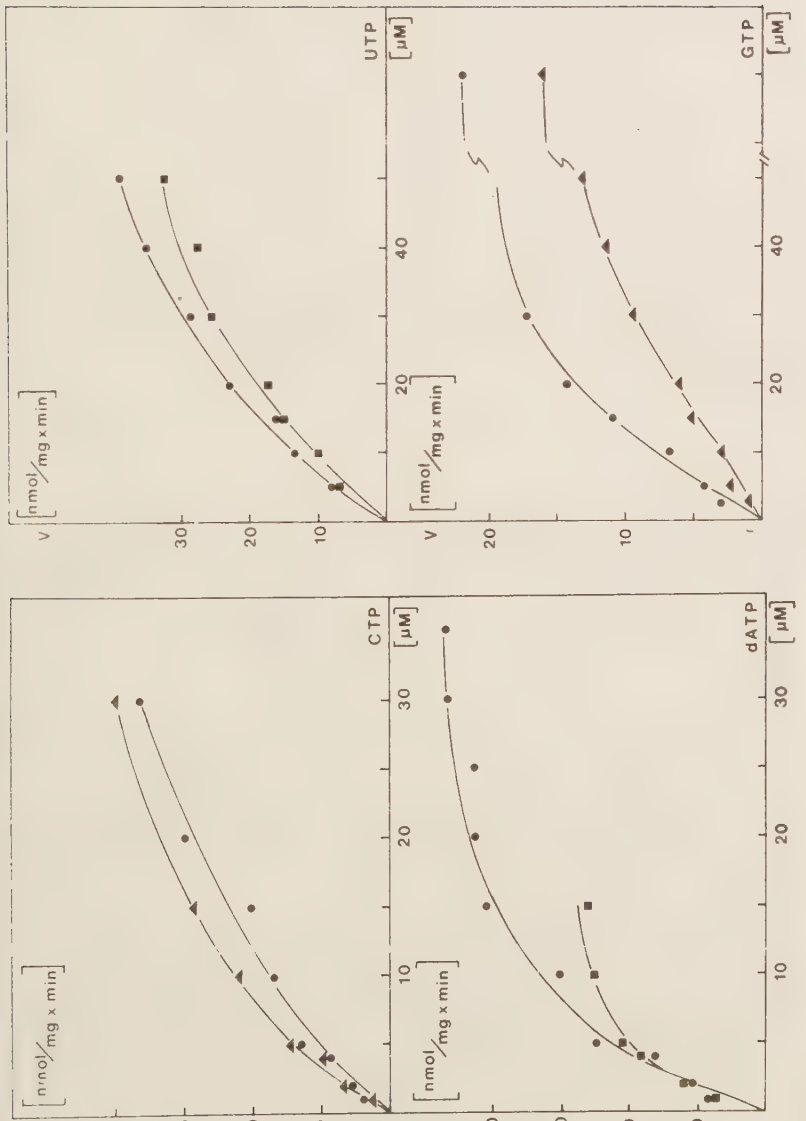


Abb. 26: Abhängigkeit der APS-Kinase-Reaktion von UTP, GTP, CTP und dATP
Die Ansätze enthielten 25 mM Imidazol/Cl pH 6.8, 1 mM $MgCl_2$ 8 mM Na_2SO_3
3,2 µM ^{35}S-APS, Inubation 3 Minuten bei 30 °C

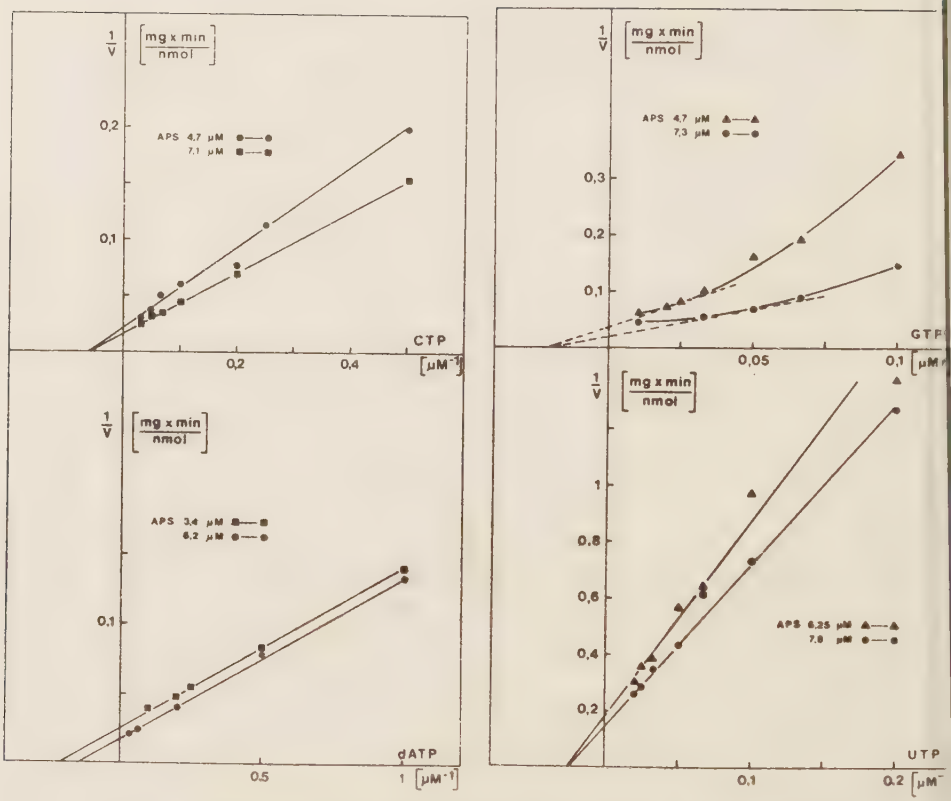


Abb. 27: Lineweaver-Burk-Auftragungen für die Abhängigkeit der Anfangsraten der APS-Kinase von UTP, CTP, GTP und dATP

Versuchsbedingungen siehe Abb. 26

In Tab. 9 sind noch einmal die aus den graphischen Auftragungen ermittelten Substrat-Bindungskonstanten (K_S) sowie die theoretisch aus dem Schnittpunkt mit der 1/S-Achse berechneten K_M-Werte für die verschiedenen Nukleosid-triphosphate aufgeführt.

Nukleotid	K_s	K_M
d ATP	-	6 µM
CTP	16 µM	15 µM
ITP	-	39 µM
UTP	40 µM	37 µM
GTP	50 µM	48 µM

Tab. 9: K_s- und K_M-Werte für Nukleosidtriphosphate

Wie schon der Vergleich der relativen Aktivitäten vermuten ließ (Tab. 8), ergaben sich für die verschiedenen Nukleosidtriphosphate mit Ausnahme von dATP und CTP K_s-Werte, die um den Faktor 5 schlechter waren als der für ATP ermittelte Wert.

2.4.7. Aktivierung durch Sulfit und Thiole

Für viele Kinasen ist bekannt, daß sie reaktive SH-Gruppen am oder im aktiven Zentrum für die katalytische Aktivität benötigen. Deshalb sollte an dem hochgereinigten Enzym aus Chlamydomonas untersucht werden, welchen Einfluß Reduktionsmittel wie Sulfit oder Thiole auf die Aktivität der APS-Kinase haben.

In Kap. 2.4.1. wurde bereits angedeutet, daß sich die Umsatzrate durch den Zusatz von Na_2SO_3 erhöhte (Abb. 12). Abhängig von der zugegebenen Menge an Sulfit ließ sich die Aktivität der APS-Kinase in vitro bis zu 300% der Kontrollrate stimulieren (Abb.28). Eine entsprechende Wirkung zeigten sowohl artifizielle Dithiole wie DTE als auch Sulfid. Diese Aktivierung war nicht nur abhängig von der eingesetzten Menge des reduzierenden Reagenz, sondern ebenfalls abhängig von der Dauer der gewählten Vorinkubation (Abb. 29).

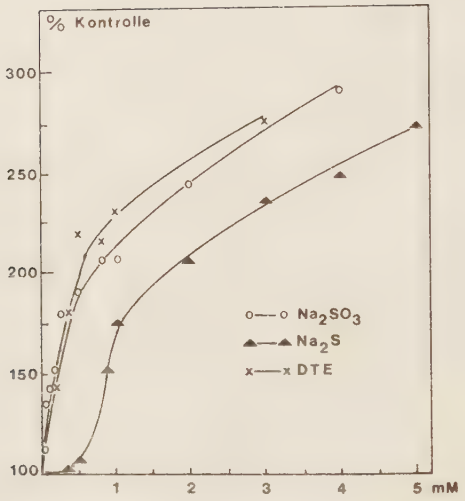


Abb. 28: Einfluß von Sulfit, Sulid und Thiol auf die Aktivität der APS-Kinase

Die Ansätze enthielten 25 mM Imidazol/Cl pH 6.8, 2 mM $MgCl_2$, 8,6 µM ^{35}S-APS, 30 µM ATP; Inkub. 4 Minuten bei 30 °C

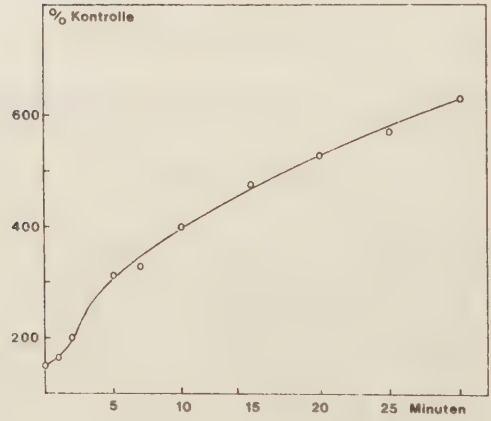


Abb. 29: Wirkung von DTE auf die APS-Kinase in Abhängigkeit von der Vorinkubation

Ansätze wie in Abb.28, jedoch zusätzlich 5 mM DTE

Dabei ließ sich die Aktivität des Enzyms bis zu einem Wert von 600% der Kontrollrate stimulieren, wenn es 30 Minuten mit einem reduzierenden Thiol vorinkubiert wurde. Eine Stimulierung um den gleichen Faktor ließ sich ebenfalls erzielen, wenn statt DTE Sulfit zugesetzt wurde (Tab. 10).

Zusatz	Aktivität [nmol/mg x min]
$-SO_3^{2-}$/-DTE	5,6
5 mM SO_3^{2-}	33,2
5 mM DTE	30,1

Tab. 10: Vorinkubation der APS-Kinase mit Sulfit und DTE

Ansätze wie in Abb. 28; Vorinkubation 15 Minuten

2.4.8. Wirkung von Hemmstoffen der SH-Gruppen

Da das Enzym in seiner katalytischen Aktivität durch Thiole stimuliert werden konnte, sollte mit Hilfe von SH-Gruppen-spezifischen Hemmstoffen untersucht werden, ob an der Katalyse Thiol-Gruppen beteiligt sind.

Dabei zeigten die Quecksilber-salze von p-Chlorobenzoat und 4-Aminophenylacetat eine äußerst effektive Hemmwirkung. Eine 50%-ige Hemmung der Aktivität wurde erreicht durch 5×10^{-6}M PCMB und 8×10^{-6}M 4-APhMAc. Zwischen der Zugabe zum Reaktionsansatz und der einsetzenden Hemmung war keine lag-Phase festzustellen. Von den übrigen getesteten Hemmstoffen war lediglich Bromsuccinimid ähnlich effektiv wie die Quecksilberverbindungen und ergab eine 50%-ige Hemmung bei einer Konzentration von

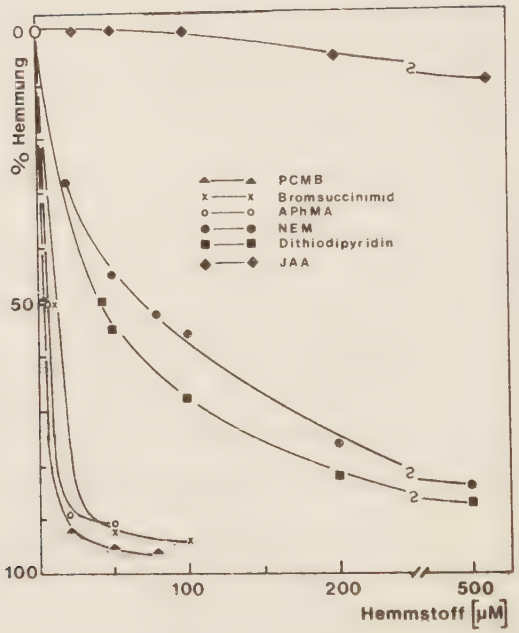


Abb. 30: Einfluß von SH-spezifischen Hemmstoffen auf die APS-Kinase-Aktivität

Die Ansätze enthielten 25 mM Imidazol/Cl pH 6.8, 2 mM $MgCl_2$, 8,6 µM ^{35}S-APS, 30 µM ATP und Hemmstoff wie angegeben. Inkubation 10 Minuten bei 30 °C.

10 x 10^{-6}M. Demgegenüber mußten 2,2'Dithiodipyridin und N-ethylmaleimid in vergleichsweise hohen Konzentrationen eingesetzt werden (50 x 10^{-6}M bzw. 72,5 x 10^{-6}M). Jodacetamid zeigte keinerlei Wirkung. Eine Vorinkubation des Enzyms mit seinen Substraten hatte keinerlei schützenden Effekt, was darauf hindeutet, daß es sich bei der Hemmung nicht um eine Veränderung der Substratbindungsstellen handelte.

Wenn NEM als Hemmstoff eingesetzt wurde, ließ sich die Hemmung durch stark reduzierende Thiole wie DTE wieder aufheben (Abb.31). Diese Aufhebung war zeitabhängig und führte nach einer 15-minütigen Vorinkubation mit DTE zur vollständigen Rekonstitution der katalytischen Aktivität.

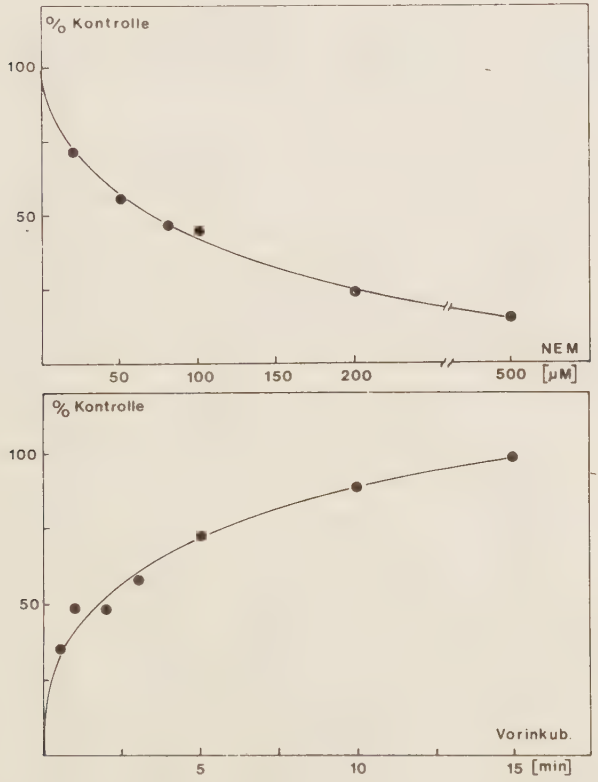


Abb. 31: Hemmung der APS-Kinase-Aktivität durch NEM und Rekonstitution durch DTE

a- Hemmung durch NEM; Ansätze wie Abb. 30

b- Rekonstitution durch DTE; das Enzym wurde 10 Minuten mit 500 µM NEM inkubiert und danach wurden 5 mM DTE zugesetzt und die Ansätze nach den angegebenen Zeiten mit den Substraten gestartet

2.4.9. Bindungsstudien

Die Biosynthese von PAPS durch die APS-Kinase benötigt zwei Substrate, APS und ATP. Die Bindung der Substrate an das Enzym kann prinzipiell auf zwei unterschiedliche Arten erfolgen: (a) APS und ATP binden nacheinander, aber in beliebiger Reihenfolge ("random"); (b) die Substrate binden nacheinander, aber

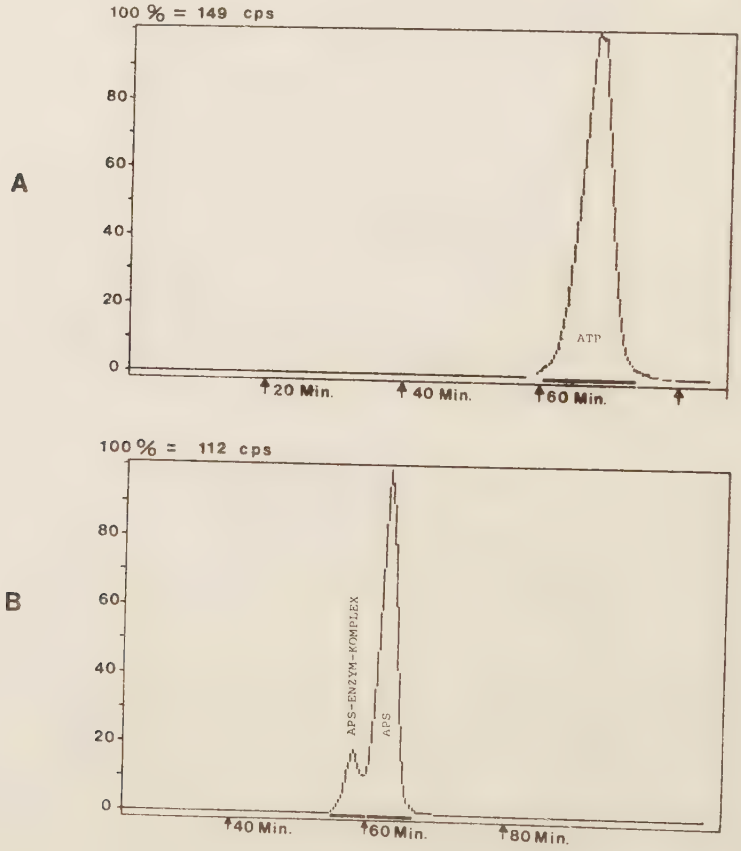


Abb. 32: Substratbindung der gereinigten APS-Kinase

Das Enzym wurde mit ^{32}P-ATP (a) oder mit ^{35}S-APS (b) inkubiert und überschüssiges Substrat durch Gelfiltration an TSK HW 55 abgetrennt; Elution 0,1 M Phosphat, 0,2 M KCl, 0,1 mM Borat, 0,1 mM EDTA, Flußrate 0,5 ml/min

ATP (APS) kann nur binden, wenn APS (ATP) bereits gebunden ist ("ordered"). Die in Kap. 2.4.3., 2.4.4. und 2.4.5. dargestellten Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß es sich bei der Enzymkatalyse um eine Ordered-BiBi-Reaktion handelt. Da die Affinität des Enzyms zu den Substraten sehr groß war, erschien es sinnvoll, die Frage nach der Reihenfolge durch direkte Bindungsstudien mit dem gereinigten Enzym zu klären.

Dazu wurde gereinigte APS-Kinase entweder mit ^{35}S-APS oder ^{32}P-ATP inkubiert. Anschließend wurde unter Verwendung eines Molekularsiebes (TSK HW 55) überschüssiges Substrat und Protein voneinander getrennt.

Abb. 32a,b zeigt den Verlauf der Radioaktivität nach der Trennung des Enzym/Substrat-Gemisches an dem Molekularsieb. Es wird deutlich, daß bei einer Inkubation der APS-Kinase mit ^{32}P-ATP nur eine einzige radioaktiv markierte Substanz von der Säule eluiert wurde (Abb. 32a). Diese Substanz konnte mittels HPLC als ATP identifiziert werden. Inkubation des Enzyms mit ^{35}S-APS ergab nach der Trennung der Probe zwei markierte Substanzen (Abb.32b).

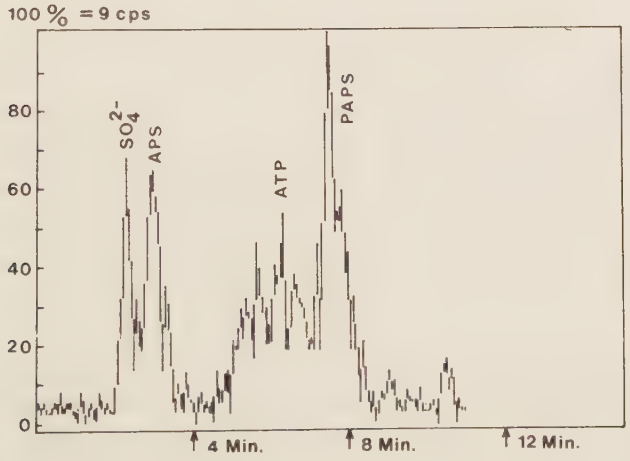


Abb. 33: Trennung eines Ansatzes mit dem APS-Enzym-Komplex und ^{32}P-ATP

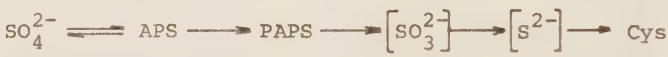
Ein Aliquot des ^{35}S-APS/Enzym-Komplexes (Abb.32) wurde komplettiert mit ^{32}P-ATP und Sulfit und für 30 Minuten inkubiert

Während der hintere Peak als ^{35}S-APS identifiziert wurde, handelte es sich bei der zweiten Substanz um den APS/Enzym-Komplex. Dieser Komplex war katalytisch aktiv. Wie aus Abb. 33 hervorgeht, führte die Zugabe von ^{32}P-ATP zum Komplex zur Biosynthese von PAPS.

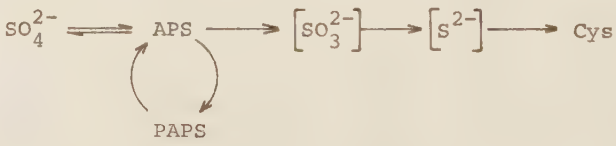
Die Bindungsstudien unterstützen somit die kinetischen Daten und die Ergebnisse zur Untersuchung der Produkthemmung. Die Reaktion der APS-Kinase scheint tatsächlich einem Ordered-BiBi-Mechanismus zu folgen, wobei APS als erstes Substrat gebunden werden muß bevor ATP gebunden werden kann.

2.5. Abgrenzung der APS-Kinase zur APS-Sulfotransferase-Aktivität

Die Funktion der APS-Kinase in der assimilatorischen Sulfatreduktion ist umstritten. Bei den Enterobakterien und Pilzen ist übereinstimmend gezeigt worden, daß PAPS zur Reduktion als aktivierte Sulfatgruppe verwendet wird:



Bei Algen (Chlorella) und höheren Pflanzen soll dagegen APS direkt zur assimilatorischen Reduktion als Sulfatdonor dienen:



Da nachweislich die Algen eine APS-Kinase besitzen, wird vorgeschlagen, daß PAPS nur nach Dephosphorylierung zu APS durch eine 3'Nukleotidase in die Assimilation eingehen kann (Übersicht bei Siegel 1975).

Wie in den vorangehenden Versuchen deutlich geworden ist, kann die APS-Kinase in vitro APS in sehr kleinen Konzentrationen zu PAPS umsetzen. Damit jedoch stehen die Reaktion der APS-Kinase und der APS-Sulfotransferase in unmittelbarer Konkurrenz um das

Substrat. Dabei würde die APS-Kinase durch ihre höhere Affinität zum Substrat eine Umsetzung von APS durch die Sulfotransferase verhindern. Es sollte deshalb untersucht werden, ob zwischen beiden enzymatischen Aktivitäten nicht eine regulatorische Kooperativität besteht, deren Ursache in einer Modifikation der Aktivität oder in ihrer strukturellen Organisation liegt.

Hinweise auf die Möglichkeit der strukturellen Organisation ergaben sich für die APS-Kinase bereits in den Vorversuchen zur Isolierung (Kap. 2.2.). Bei einer Beschallung mit 9000 Wsec war der Anteil an APS-Kinase, der freigesetzt wurde, geringer als bei einer Behandlung mit 60000 Wsec. Entsprechend sank dabei der Anteil der APS-Sulfotransferase an der Gesamtaktivität ab. Bei der Chromatographie an Sephacryl S 300 zeigte sich dann, daß die APS-Sulfotransferase-Aktivität weniger APS-Kinase enthielt. Da die Kinase mit einem Molekulargewicht von 45.000 bei der Gelfiltration vollständig abgetrennt werden konnte, dagegen die Trans-

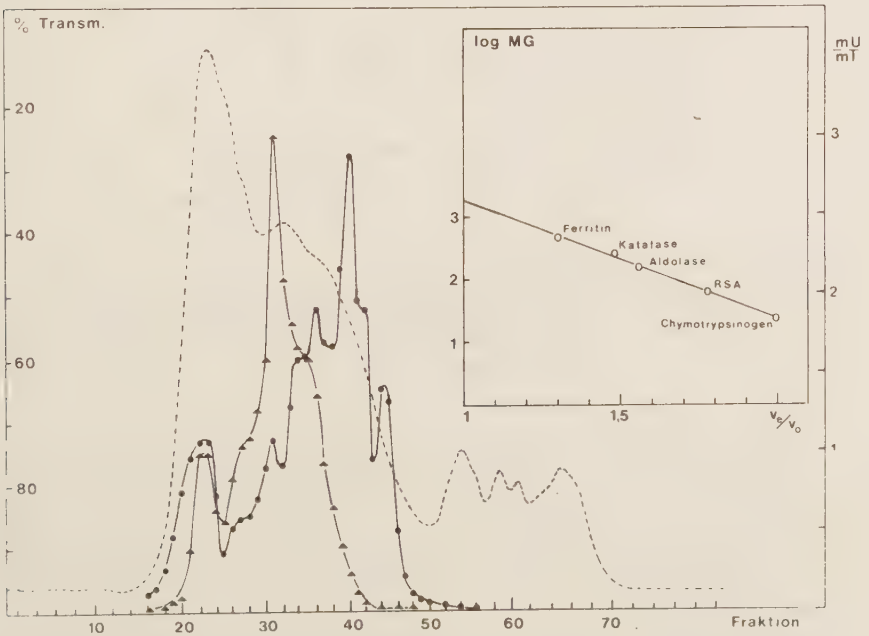


Abb. 34: Trennung eines Rohextraktes aus C.reinhardtii durch Gelfiltration an Sephacryl S 300

Bedingungen siehe Abb. 6

ferase auch bei der längeren Beschallung immer noch mit Kinase-Aktivität bei einem Molekulargewicht von 190-285.000 gleichzeitig eluiert wird (Abb. 34), kann ein Komplex zwischen beiden Enzymen vermutet werden.

Wenn die APS-Sulfotransferase aus dem mitteleren Bereich des Molekularsiebes rechromatographiert wurde (Fraktion 26-32), konnte erneut freie APS-Kinase nachgewiesen werden (Abb. 35).

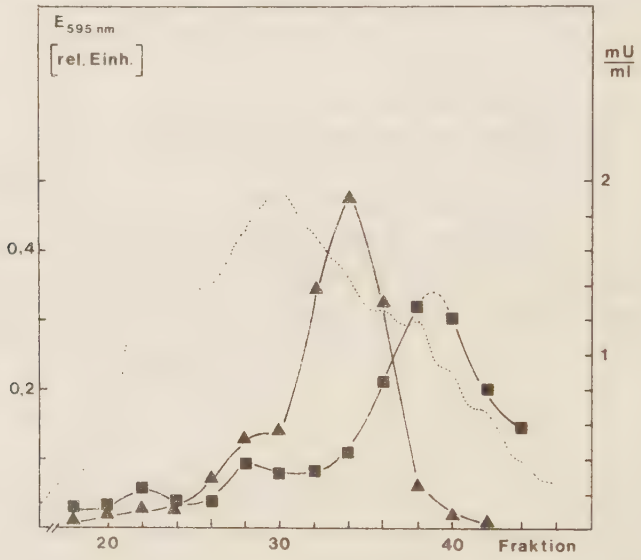


Abb. 35: Elutionsdiagramm nach Rechromatographie der Fraktionen 26-32 nach Sephacryl S300 an dem gleichen Molekularsieb

Bedingungen siehe Abb. 6

Dabei war festzustellen, daß sich das Maximum der Sulfotransferase-Aktivität zu etwas kleineren Molekulargewichts-Bereichen verschob (app. Molekulargewicht von 285 kD zu 190 kD), während durch die Behandlung mit EDTA und niedrigen Pufferkonzentrationen wiederum Kinase-Aktivität im Fraktionierungsbereich von 90 kD nachzuweisen war.

Es konnte gezeigt werden, daß die APS-Kinase in der Sulfotransferase-Fraktion enthalten gewesen sein mußte. Dazu wurden die

Messungen für beide Enzym-Aktivitäten gleichzeitig in der gleichen Fraktion durchgeführt (Tab. 11).

Zusatz	Inkub. [min]	APS-Sulfotr. [nmol SO_3/Ans.]	APS-Kinase [nmol PAPS/Ans.]
+ ATP + DTE	4	0,73	1,67
+ ATP + DTE + SO_3	4	0,92	1,72
+ ATP + SO_3	2	0,03	1,60
+ DTE	2	0,24	1,42

Tab. 11: Bestimmung der Aktivitäten von APS-Sulfotransferase und APS-Kinase in der gleichen Fraktion

Die Ansätze enthielten 25 mM Imidazol/Cl pH 6.8, 1 mM $MgCl_2$, 6 µM ^{35}S-APS; 50 µM ATP, 8 mM Na_2SO_3, 5 mM DTE wenn angegeben

Vergleicht man in diesem Versuch die Gesamtmengen an PAPS und an austauschbarem Sulfit nach 4 Minuten Reaktionszeit, wenn beide Testsysteme optimal mit Substraten ausgestattet wurden, mit dem Versuch, in dem zunächst die APS-Kinase vorinkubiert und erst danach die Sulfotransferase abläuft, dann zeigte sich, daß die APS-Kinase vergleichbare Mengen an PAPS produziert hatte, wohingegen die Sulfotransferase wesentlich weniger Sulfit gebildet hatte (0,03 nmol/Ansatz), als das in der entsprechenden Zeit in der nicht sequentiellen Inkubation zu erwarten gewesen wäre. Insbesondere fiel auf, daß in Gegenwart von ATP die Menge an austauschbarem Sulfit von 0,24 nmol/Ansatz auf 0,03 nmol zurückging.

Wurden in einer Kinetik (Abb. 36) gleichzeitig APS-Kinase und APS-Sulfotransferase-Aktivität gemessen (an Hand ihrer Reaktionsprodukte), dann zeigte sich, daß das austauschbare Sulfit sehr schnell akkumulierte, freies PAPS aber erst nachdem die Konzen-

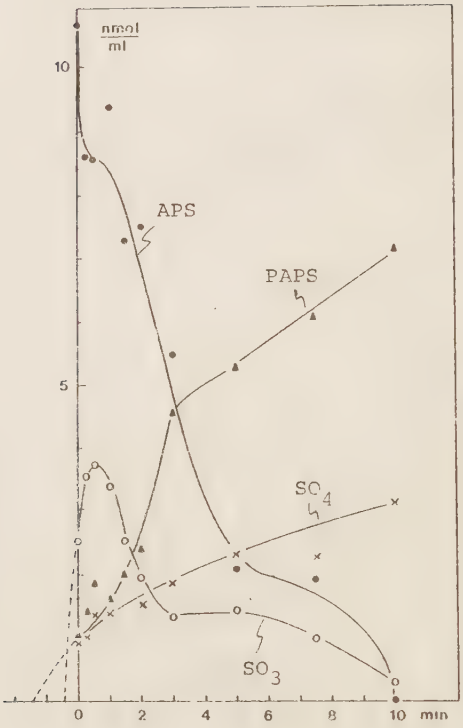


Abb. 36: Kinetik der Bildung von PAPS und Sulfit in einem Rohextrakt aus C.reinhardtii

Gesamtvolumen 5 ml, 25 mM Tris/Cl pH 8, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,3 mM ATP, 20 µM ^{35}S-APS. Aliquots von 250 µl wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen und analysiert

tration des Sulfits das "steady-state"-Niveau erreicht hatte. Da für diese Messungen keine "stopped-flow"-Messungen gemacht wurden, konnte erst nach 120 Sekunden Reaktionszeit die Konzentration der Reaktionsteilnehmer gemessen werden. Bei Extrapolation der Raten gegen t_o kann jedoch angenommen werden, daß die Konzentration des austauschbaren Sulfits noch vor der des PAPS gegen Null geht. Dieses Verhalten kann jedoch nur eintreten, wenn tatsächlich PAPS Donor der Sulfonylgruppe ist.

Weitere Hinweise auf die mögliche strukturelle Organisation von APS-Kinase und APS-Sulfotransferase ergaben sich aus der Nebenaktivität gereinigter APS-Sulfotransferase[+] (Tab. 12).

Ansatz	PAPS [nmol/Ansatz]
APS-ST, APS-K, DTE	4,11
APS-ST, --- , DTE	2,83
--- , APS-K, DTE	6,39

Tab. 12: Bildung von PAPS unter Verwendung gereinigter APS-Kinase und APS-Sulfotransferase

Die Ansätze enthielten 50 mM Tris/Cl pH 7.4, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM DTE, 4 mM Na_2SO_3, 10 µM ^{35}S-APS, 60 µM ATP und gereinigte APS-Kinase und Transferase wie angegeben; Inkub. 15 Min. bei 30 °C

Da nach einer mehr als 800-fachen Anreicherung der APS-Sulfotransferase das Enzym immer noch APS-Kinase-Aktivität enthielt, die ausreichend hoch war, die Transferase mit aktiviertem Sulfat zu versorgen, kann ein Komplex beider Enzyme nicht ausgeschlossen werden. Unterstützung für diese Hypothese wurde während der Reinigung der APS-Sulfotransferase erhalten: die Transferase trat nicht homogen sondern in zwei Teilaktivitäten auf, die sich voneinander um das Molekulargewicht von 40-50.000 unterschieden (Schwenn, pers. Mitteilung). Die Bestätigung, daß es sich bei der Fraktion mit dem app. Molekulargewicht von 90-85.000 um die APS-Kinase-freie, dagegen bei der Fraktion mit dem Molekulargewicht von 285.000 bzw. 190.000 um einen Komplex aus APS-Kinase und Transferase handelt, steht noch aus.

+) Gereinigte APS-Sulfotransferase wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Schwenn zur Verfügung gestellt

3. Diskussion

3.1. Stellung der APS-Kinase in der assimilatorischen Sulfatreduktion

Die Assimilation des Sulfatschwefels durch höhere Pflanzen zum organisch gebundenen Schwefel in Aminosäuren, Coenzymen und Proteinen erfordert die Reduktion des Sulfates (Oxidationszahl +6) zu Sulfid (Oxidationszahl -2). Dabei wird die Redoxstufe des Sulfit (Oxidationszahl +4) durchlaufen. Da das Redoxpotential für die Reaktion

$$SO_4^{2-} + 2\ e^- + 2\ H^+ \longrightarrow SO_3^{2-} + H_2O$$

mit -480 mV so negativ ist, daß physiologische Reduktionsmittel wie Ferredoxin oder NADPH nicht ausreichen würden, muß das Sulfat vor der Reduktion "aktiviert" werden. Die Aktivierung erfolgt durch das Enzym ATP-Sulfurylase (E.C. 2.7.7.4) gemäß

$$SO_4^{2-} + ATP \rightleftharpoons APS + PP_i \qquad G_o' = +\ 11\ kcal/mol$$

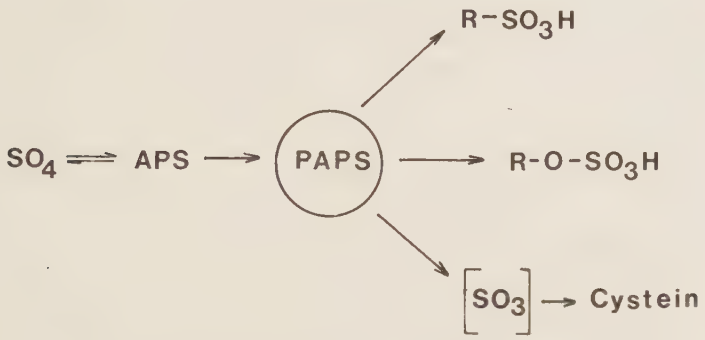
wobei das Adenylylsulfat APS entsteht. Das Adenylylsulfat könnte mit den in der Pflanze vorliegenden Reduktionsmitteln reduziert werden

$$APS + 2\ e^- + H^+ \longrightarrow HSO_3^{2-} + AMP \qquad E_o' = -\ 60\ mV$$

da nun das Redoxpotential E_o' auf - 60 mV verringert worden ist. Die Knüpfung der Phospho-Schwefelsäure-Anhydrid-Bindung im APS ist jedoch so endergon (G_o' = +11 kcal/mol), daß das Adenylylsulfat nur in extrem geringen Konzentrationen vorliegt. Für die physiologischen Bedingungen in vivo wurden nicht mehr als 10^{-5}M APS vermutet, und das auch nur dann, wenn gleichzeitig das Pyrophosphat durch die Pyrophosphatase abgezogen wird (Siegel 1975). Durch Ankoppelung der APS-Kinase (Adenylylsulfat:Phosphotransferase, E.C. 2.7.1.25) wird das APS aus dem Gleichgewicht entfernt:

$$APS + ATP \longrightarrow PAPS + ADP \qquad G_o' = -\ 5\ kcal/mol$$

Diese Reaktion ist irreversibel, so daß PAPS als Reaktionsprodukt akkumulieren kann. Die Sulfatgruppe im PAPS besitzt ein so großes Übertragungspotential, daß Reduktion oder Sulfattransfer in Richtung der Reaktionsprodukte verlaufen ("universeller Sulfatgruppen-Donor"):



Über die APS-Kinase gibt es bisher nur wenige Untersuchungen. Zwar konnte das Enzym nachgewiesen werden in Algen (Schiff und Hodson 1970, Hodson et al 1968, Sawhney und Nicholas 1976) und höheren Pflanzen (Mercer und Thomas 1969, Burnell und Anderson 1973), aber Untersuchungen an einer teilweise gereinigten Kinase liegen nur für das Enzym aus Hefe (Robbins und Lipman 1958, Robbins 1962), Nitrobacter (Varma und Nicholas 1971) und Chlamydomonas reinhardtii (Schwenn und Jender 1981) vor.

In der vorliegenden Arbeit sollten genauere Untersuchungen an dem hochgereinigten isolierten Enzym durchgeführt werden, um zu klären, ob die Eigenschaften der APS-Kinase und der Mechanismus der Katalyse in vitro geeignet sind, die vollständige Aktivierung des Sulfat zu PAPS in vivo zu gewährleisten. Dazu sollte zunächst die Aktivität des Enzyms in verschiedenen Organismen gemessen werden, um eine geeignete Quelle zur Reinigung der APS-Kinase zu finden. Zur Charakterisierung der enzymatischen Aktivität sollte der Mechanismus genauer untersucht werden. Dazu gehörte z.B. die Frage, ob der Ablauf der enzymatischen Reaktion einem sequentiellen oder einem nicht-sequentiellen Mechanismus

folgt, sowie die Untersuchung der Bindungsstellen am Enzym. Da es sich bei beiden Substraten um Adenosinnukleotide handelt, waren ungeachtet des tatsächlichen Mechanismus Interaktionen zwischen den Substratbindungsstellen zu erwarten.

Die bisher veröffentlichten Meßverfahren (Übersicht bei Schwenn und Urlaub 1981) verwendeten gekoppelte enzymatische Tests zur Bestimmung des gebildeten PAPS oder ADP. Um die Messung der Anfangsraten der Enzymkatalyse zu ermöglichen, war es daher notwendig, eine neue Methode zu entwickeln, die es erlaubte, das gebildete PAPS von den übrigen Nukleotiden abzutrennen und direkt zu bestimmen.

3.2. Methode und Reinigung

3.2.1. Meßmethodik

Bei den bisherigen Untersuchungen der APS-Kinase wurden zumeist gekoppelte enzymatische Tests als Meßmethode verwendet (Übersicht bei Schwenn und Urlaub 1981), so daß genauere Aussagen über die Eigenschaften des isolierten Enzyms nicht oder nur schlecht möglich waren. Aufgrund der hohen Affinität, die das Enzym bei der niedrigen Gleichgewichtskonzentration des APS von 10^{-5}M für ihr Substrat besitzen muß, kann man davon ausgehen, daß die angekoppelten Testsysteme limitierend*waren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die katalytische Aktivität der APS-Kinase für die Reaktion

$$\text{APS} + \text{ATP} \longrightarrow \text{PAPS} + \text{ADP}$$

gemessen, indem die ATP-abhängig gebildete Menge an ^{35}S-PAPS aus ^{35}S-APS bestimmt wurde. Die notwendige Abtrennung des PAPS von den übrigen Reaktionspartnern wurde durch die Selektivität der Trennung der Nukleotide mit Reversed-Phase HPLC erreicht und die gleichzeitige Verwendung von hochmarkiertem ^{35}S-APS als Substrat (spez. Akt. 30.000 cpm/nmol) ermöglichte eine hohe Empfindlichkeit bei einer Nachweisgrenze von 200 nmol PAPS/l.

*) limitierend in dem Sinn, daß die Affinitäten der Indikatorenzyme für die Produkte zu niedrig waren

3.2.2. Reinigung der APS-Kinase

Für die Reinigung wurde in Chlamydomonas reinhardtii ein Organismus gefunden, der folgende Voraussetzungen erfüllte: (a) hohe APS-Kinase-Aktivität, (b) leichte Zugänglichkeit des Enzyms und (c) problemlose Anzuchtmöglichkeit. Das Zurückgreifen auf eine Grünalge als Quelle des Enzyms war darüberhinaus sinnvoll, da deren photosynthetischer Apparat dem der höheren Pflanzen vergleichbar ist.

Die entwickelte Methode ermöglicht eine einfache und gut reproduzierbare Anreicherung der APS-Kinase. Die Verwendung der Chromatofokussierung erwies sich als sehr effektiver Reinigungsschritt (Tab. 3), zumal bei guter Trennleistung sehr große Volumina problemlos verarbeitet werden konnten. Die Messungen der Enzymaktivität im weiteren Verlauf der Reinigung gaben jedoch Anlaß zu der Vermutung, daß die zur Elution verwendeten Ampholyte (PB^{TM} 74, Pharmacia) hemmend auf die Enzymkatalyse wirkten. Die Verwendung der Substrate als Elutionsmittel erschwerte die genaue Bestimmung der spezifischen Aktivität nach der Chromatographie an 2'5'ADP-Agarose. Da gezeigt werden konnte, daß APS-Konzentrationen größer 10 µM hemmend auf die Aktivität des Enzyms wirkten, ist davon auszugehen, daß die tatsächliche spezifische Aktivität nach diesem Schritt größer war als die gemessenen 135 mU/mg. Aufgrund dieser Schwierigkeit wurde für die Untersuchungen der APS-Kinase das gereinigte Enzym nach der Chromatofokussierung benutzt, da auch die geringe Ausbeute von 3% eine Verwendung des hochgereinigten Enzyms für routinemäßige Messungen ausschloß.

Durch die Erzielung eines hohen Anreicherungsfaktors bereits nach zwei säulenchromatographischen Schritten eröffnete sich die Möglichkeit, unter Verwendung der gereinigten APS-Kinase die bisherigen Herstellungsmethoden für PAPS (Robbins 1962, Hodson und Schiff 1969) zu verbessern. Im Vergleich zur Benutzung von zellfreien Extrakten als Quelle des sulfataktivierenden Systems verlief die Biosynthese von PAPS effizienter durch den kontrollierten Einsatz der reinen an der Aktivierung beteiligten Enzyme.

3.3. Eigenschaften, Cofaktoren-Abhängigkeit und Reaktionsmechanismus der APS-Kinase

Der größte Teil der Phosphorylgruppen-übertragenden Enzyme, insbesondere die Kinasen, benötigen divalente Metall-Ionen für maximale katalytische Aktivität, da der $M^{II}ATP^{2-}$-Komplex das eigentliche Substrat darstellt. Für das teilweise gereinigte Enzym aus Hefe konnte gezeigt werden, daß die Reaktion Mg^{2+}-abhängig war (Robbins und Lipman 1958). Als weitere Metall-Ionen waren in diesem System ebenfalls Co^{2+} und Mn^{2+} aktiv.

Diese Beobachtungen konnten in den eigenen Versuchen nur zum Teil bestätigt werden. Die Aktivität der gereinigten APS-Kinase aus C. reinhardtii war abhängig von Mg^{2+}, wobei abhängig von der eingesetzten Menge an Substrat höhere Magnesiumkonzentrationen hemmend wirkten. Dieser Effekt erklärt sich aus der Tatsache, daß der Mg_2ATP^{o}-Komplex katalytisch inaktiv ist. In Übereinstimmung mit den Versuchen von Robbins war Mn^{2+} nahezu in gleichem Maß aktiv (90% der Mg^{2+}-Kontrolle). Im Gegensatz zum Hefe-Enzym wirkte Co^{2+} jedoch stark hemmend auf die enzymatische Aktivität (37% Restaktivität) und Cu^{2+} führte zu einer fast vollständigen Inaktivierung (10% der Kontrolle).

Auffallend war die hohe verbleibende Aktivität des Enzyms (40%), wenn kein Mg^{2+} im Reaktionsansatz vorhanden war. Auch der Zusatz von 2 mM EDTA führte nicht zu einer vollständigen Hemmung der katalytischen Aktivität. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für den angereicherten APS-Kinase/PAPS-Reduktase-Komplex aus Nitrobacter beschrieben (Varma und Nicholas 1971), der ebenfalls in Abwesenheit von Mg^{2+} noch 37% der Aktivität der Kontrollrate besaß. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in dem Vorliegen von intramolekular gebundenem Magnesium liegen, wie dies für die Adenosin-Kinase aus Hasenleber beschrieben wurde (Miller et al 1979).

Eine Abhängigkeit von monovalenten Kationen wie sie z.B. für die Pyruvat-Kinase (Boyer 1962) beschrieben wurde, konnte für die APS-Kinase nicht eindeutig festgestellt werden. Zwar führte die Zugabe von KCl zu einer Stimulierung der Aktivität um 60%, doch wurde die Umsatzrate durch Zugabe von KNO_3 nur um 20% erhöht, so daß ein positiver Effekt von K^+-Ionen zwar nicht auszuschließen

ist, aber auch nicht eindeutig bejaht werden kann. Daß es sich bei diesem unterschiedlichen Verhalten um einen Aktivitäts-steigernden Effekt durch Cl^--Ionen handelt, wie z.B. für eine Arylsulfatase beschrieben wurde (Webb und Morrow 1959), kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da NaCl keine nennenswerte Steigerung der Rate ergab.

Zum pH-Optimum der APS-Kinase liegen bisher nur wenige und voneinander abweichende Daten vor. Für das Enzym aus Spinatchloroplasten fanden Burnell und Anderson für die Bildung von PAPS aus Sulfat und ATP ein Optimum von 8,5 (Burnell und Anderson 1973), was mit den Messungen von Robbins an dem Enzym aus Hefe übereinstimmt (Robbins 1962). Dieser Wert scheint das Optimum für das gekoppelte System aus ATP-Sulfurylase und APS-Kinase zu sein, da für die gereinigte ATP-Sulfurylase aus Spinat ein pH-Optimum von pH 7,5-8,5 ermittelt werden konnte (Shaw und Anderson 1972). Bei Messungen an dem APS-Kinase/PAPS-Reduktase-Komplex aus Nitrobacter (Varma und Nicholas 1971) konnte ein pH-Optimum von 7,6 für die Bildung von austauschbarem Sulfit aus APS und ATP bestimmt werden.

In den eigenen Versuchen konnte für das gereinigte Enzym aus C. reinhardtii ein optimaler pH-Bereich von 6,5-6,8 ermittelt werden. Dieser Wert liegt nur knapp über dem pI-Wert des Enzyms von 6,2 und läßt sich außerdem gut mit dem pK_2-Wert der Phosphatgruppe im ATP korrelieren. Das gefundene pH-Optimum der APS-Kinase ist gut geeignet, auch die weitere Umsetzung des gebildeten PAPS sicherzustellen. So wurde für die Sulfitreduktase, die ebenso wie die APS-Kinase ein membrangebundenes Enzym ist, in Bakterien ein pH-Optimum von 6,0 gefunden (Schedel 1979) und in Zellkulturen von Catharanthus ein Optimum um pH 7 (Kemena 1981). Für die Bildung von Sulfolipid aus PAPS, für die Hoppe ebenfalls die Beteiligung membrangebundener Strukturen wahrscheinlich machen konnte (Hoppe 1980), findet man ebenfalls ein Optimum um pH 7 - 7,3.

Für viele Kinasen ist bekannt, daß sie reaktive SH-Gruppen zur katalytischen Aktivität benötigen. Die hemmende Wirkung von Co^{2+} und Cu^{2+} deutete schon darauf hin, daß auch für die Aktivität der APS-Kinase das Vorkommen von SH-Gruppen am oder im aktiven Zentrum notwendig sein könnte. Das Vorliegen eines leicht

sauren Milieus würde daher dazu führen, daß die SH-Gruppen des Enzyms als ein Gemisch aus $R\text{-}S^-$ und R-SH vorliegen (pK_a=8,33; pK_b=5,7 für Cystein). Daß das Vorkommen reduzierter SH-Gruppen für die katalytische Aktivität notwendig ist, konnte auch durch die Verwendung von Reduktionsmitteln gezeigt werden. Die Zugabe steigender Mengen an Sulfit zum Reaktionsansatz führte zu einer Erhöhung der Umsatzrate auf 300%. Die gleiche Stimulierung konnte auch durch Dithiole wie DTE oder DTT und Sulfid erzielt werden. Diese Aktivierung des Enzyms war zeitabhängig und konnte bei einer Vorinkubation von 30 Minuten mit Sulfit oder DTE bis auf 600% der Kontrollrate gesteigert werden. Demgegenüber führte die Zugabe von SH-Gruppen-spezifischen Hemmstoffen zu einer deutlichen Hemmung der Aktivität. Unter Berücksichtigung der schon erwähnten Hemmung durch Cu^{2+} und Co^{2+} liegt der Schluß nahe, daß die Katalyse durch die Bildung von Metallkomplexen mit Protein-SH-Gruppen beeinträchtigt wird. Da die Hemmung durch eine Vorinkubation mit den Substraten nicht verhindert werden konnte, wohl aber durch DTE die Aktivität wieder rekonstituiert werden konnte, lassen diese Ergebnisse darauf schließen, daß es sich bei der Stimulierung durch Sulfit und Thiole eher um eine Beeinflussung katalytisch aktiver SH-Gruppen handelt als um eine Veränderung der Substratbindungsstellen, zumal wenn man davon ausgeht, daß die Adenylylverbindungen bzw. ihre Mg^{2+}-Komplexe die eigentlichen Substrate des Enzyms sind.

Obwohl die Bindungskonstanten für die APS-Kinase-Reaktion bisher unbekannt sind, wurde durch die Untersuchungen an teilweise gereinigten Enzymen aus Hefe (Robbins 1962) und Chlamydomonas (Schwenn und Jender 1981) sowie an Schwefelbakterien (Kap. 2.2.) deutlich, daß die APS-Kinase eine sehr hohe Affinität zu ihren Substraten besitzt, wobei die app. K_M-Werte sowohl für APS als auch für ATP im Mikromolar-Bereich liegen.

Die isolierte APS-Kinase aus C. reinhardtii zeigte die erwartet hohe Affinität zu ihren Substraten. Für ATP konnte ein K_M-Wert von 8 µM ermittelt werden, während für APS nur ein app. K_s-Wert von 1 µM zu bestimmen war (s.w.u.), aus dem sich rechnerisch ein K_M von 0,2 µM ergab.

Bezüglich der Nukleosid-triphosphate war eine deutliche, aber nicht ausschließliche Spezifität für Adenosinnukleotide festzustellen. Während für das Enzym aus Hefe beschrieben wurde, daß CTP und ATP gleichwertige Aktivitäten ergaben und UTP, GTP sowie ITP eine noch höhere Rate gewährleisteten (Robbins 1962), zeigte sich in den eigenen Versuchen an der gereinigten Kinase aus C. reinhardtii, daß lediglich dATP eine ähnlich hohe Affinität aufwies wie ATP. Die Tatsache, daß von den übrigen Nukleosid-triphosphaten lediglich CTP die Aktivität gut unterstützte, läßt darauf schließen, daß für die Bindung an das aktive Zentrum eine Aminogruppe am C6 des Purin- bzw. Pyrimidinringes notwendig ist.

Für den Ablauf der APS-Kinase-Reaktion sind prinzipiell zwei verschiedene Mechanismen denkbar:

(a) sequentiell, d.h. erst wenn beide Substrate, APS und ATP, am katalytischen Zentrum gebunden haben unter Bildung eines ternären Komplexes, kann die Reaktion stattfinden und die Produkte, PAPS und ADP freigesetzt werden;

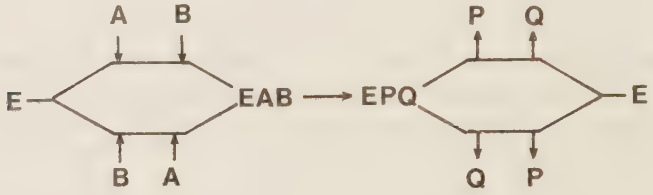
(b) nicht-sequentiell (ping-pong), d.h. das erste Produkt, PAPS oder ADP, wird freigesetzt, bevor das zweite Substrat an das Enzym gebunden wird. Dabei erhält man als Zwischenstufe ein phosphoryliertes Enzym, so daß bei diesem Mechanismus ATP als erstes Substrat binden müßte.

Bei Messungen der Anfangsraten im Bereich höherer Substratkonzentrationen führte die graphische Auftragung nach Lineweaver-Burk zu scheinbar parallelen Geraden, was für einen ping-pong-Mechanismus spräche. Unter den Phosphorylgruppen-transferierenden Enzymen wurde ein solcher Mechanismus bisher nur für die Nukleosid-diphosphat-Kinase wahrscheinlich gemacht (Mourad und Parks 1966).

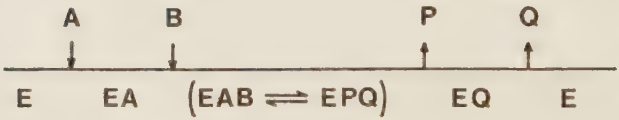
Demgegenüber wiesen die Bestimmungen der Enzymaktivität bei Konzentrationen im Bereich der K_M-Werte eindeutig auf einen sequentiellen Mechanismus der APS-Kinase-Reaktion hin. In dieser Hinsicht entspricht die Katalyse der vieler anderer Kinasen wie

Creatin-Kinase (Morrison und James 1965), Hexokinase (Hammes und Kochosi 1962) oder Galaktokinase (Gulbinski und Cleland 1968). Für den sequentiellen Verlauf einer BiBi-Reaktion ist es prinzipiell denkbar, daß die Substrate (a) "random" oder (b) "ordered" an das Enzym binden. In der verkürzten Schreibweise nach Cleland (Cleland 1963) bedeutet dies

(a)



(b)



wobei A und B im Falle der APS-Kinase APS und ATP, P und Q ADP und PAPS bedeuten.

Beide Mechanismen werden durch die allgemeine Gleichung

$$(1) \qquad v = \frac{V_{max} \cdot [A] \cdot [B]}{K_S^A K_M^B + K_M^A [B] + K_M^B [A] + [A] \cdot [B]}$$

beschrieben.

Bildet man den reziproken Ausdruck und stellt 1/v als Funktion von 1/A bzw. 1/B dar, so wird ersichtlich, daß für beide denkbaren Mechanismen in einer Auftragung nach Lineweaver-Burk eine Reihe von Geraden erhalten werden mit einem Schnittpunkt links von der 1/v-Achse. Die Lage dieses gemeinsamen Schnittpunktes, auf, über oder unter der 1/S-Achse, läßt dabei aber keinerlei Aussagen über den tatsächlichen Mechanismus zu. Vielmehr ist die Lage abhängig davon, ob zwischen den Substratbindungsstellen kooperative Beziehungen bestehen oder nicht. Dabei können geringe Fehler in der Bestimmung der Anfangsraten oder der zeichnerischen Darstellung die Ergebnisse stark verfälschen. Bei einer näheren Betrachtung der in Abb. 16c und 17b dargestellten Versuche ist die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß die Geraden einen gemeinsamen Schnittpunkt auf der 1/v-Achse haben. Für den Fall, daß die Geschwindigkeitskonstanten für die Dissoziation des EA-Komplexes größer ist als V_{max} verschwindet der $K_M^A[B]$-Faktor in Gl.(1) und man erhält für die reziproken Werte

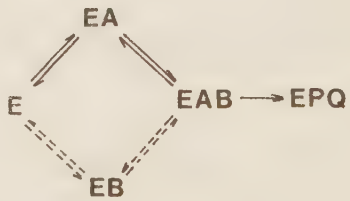
$$\frac{1}{v} = \frac{K_S^A K_M^B}{[B]} \cdot \frac{1}{[A]} \cdot \frac{1}{V} + \left(1 + \frac{K_M^B}{[B]}\right)\frac{1}{V} \qquad (2)$$

$$\frac{1}{v} = \left(K_M^B + \frac{K_S^A K_M^B}{[A]}\right)\frac{1}{[B]} \cdot \frac{1}{V} + \frac{1}{V} \qquad (3)$$

Aus Gl.(3) wird ersichtlich, daß bei verschiedenen konstanten Konzentrationen von APS (ATP) die doppelt-reziproken Auftragungen für 1/v gegen 1/APS bzw. 1/ATP alle durch einen gemeinsamen Punkt auf der 1/v-Achse verlaufen würden. Ein slope-replot für die Gl.(2) ergäbe eine Gerade durch den Ursprung. Tatsächlich könnte der in Abb. 15c dargestellte slope-replot in Anbetracht der oben erwähnten Fehlerquellen auch durch den Nullpunkt verlaufen. Daraus würde sich ergeben, daß mit steigenden Konzentrationen an ATP die für die Enzymkatalyse benötigten Konzentrationen an APS vernachlässigbar klein werden und gegen Null gehen, d.h. APS als erstes Substrat würde in einer Gleichgewichtsreaktion gebunden ($K_S^{APS} \gg K_M^{APS}$). Die gefundenen kinetischen Da-

ten für APS und ATP (K_S^{APS} = 1 µM, K_M^{APS} = 0,2 µM, K_M^{ATP} = 8 µM) wären daher in Übereinstimmung mit einem solchen, als "rapid equilibrium ordered" bezeichneten Mechanismus, wobei APS als erstes Substrat gebunden wird.

Demgegenüber ergaben sich bei den Messungen der Anfangsraten in einer Auftragung von v gegen S jedoch keine typisch hyperbolischen Kurvenverläufe, wie dies für eine Michaelis-Menten-Kinetik zu erwarten gewesen wäre. Vor allem bei Messungen im Bereich der K_M-Werte war nicht eindeutig zu klären, ob die Kurven einen sigmoiden Verlauf zeigten. Ungeachtet der Tatsache, daß dieses Verhalten typisch für allosterische Enzyme ist, könnte diese Beobachtung in Übereinstimmung mit den oben genannten K_S- und K_M-Werten für die beiden Substrate dahingehend interpretiert werden, daß die Katalyse nicht dem oben beschriebenen "rapid ordered equilibrium"-Mechanismus folgt, sondern einem "partial rapid equilibrium random ordered"-Mechanismus, wie er z.B. für eine Aldolase aus Rhodomicrobium beobachtet wurde (Jensen und Trentini 1970):



Dabei ist der Weg E-EA-EAB aufgrund der Geschwindigkeitskonstanten bevorzugt, ohne daß aber eine mögliche Katalyse über EB ausgeschlossen wäre. Wird A variiert bei konstantem B so wird sich zunächst EAB über E-EB-EAB bilden. Bei einer bestimmten Konzentration an A wird jedoch der Weg über E-EA-EAB vorherrschend und die Rate steigt schneller an, so daß insgesamt ein sigmoider Verlauf herauskommt.

Eine Klärung der Frage, ob die Bindung der Substrate "random" oder "ordered" erfolgt, brachten Bindungsstudien an der gereinigten Kinase (Kap. 2.4.9.). Dabei konnte gezeigt werden, daß sich

bei einer Inkubation des Enzyms mit APS ein APS/Enzym-Komplex bildet, während eine Bindung von ATP (in Abwesenheit von APS) nicht beobachtet werden konnte.

Eine weitere Möglichkeit die beobachteten nicht-hyperbolischen Kurvenverläufe zu interpretieren, liegt in dem Vorliegen von Interaktionen zwischen den Substratbindungsstellen (Kooperativität). Erste Hinweise auf kooperative Vorgänge bei der Enzymkatalyse ergaben sich bei der Bestimmung der R_S-Werte. Dieser Quotient, der allgemein definiert ist aus

$$v = \frac{[S]^n}{K' + [S]^n} \cdot V_{max} \qquad \text{mit } K' = K_s \; (a^{n-1} \; b^{n-2} \ldots z^1)$$

$$R_S = \frac{S_{0,9}}{S_{0,1}} = \sqrt[n]{81}$$

gibt in grober Näherung Aufschluß darüber, ob kooperatives Verhalten vorliegt oder nicht. Dabei bedeuten

R_S-Werte	größer	81	negative Kooperativität
R_S-Werte	gleich	81	keine "
R_S-Werte	kleiner	81	positive "

Die in Abb. 14a und 16a dargestellten Abhängigkeiten der Anfangsraten bei hohen APS- und ATP-Konzentrationen lassen aufgrund der ermittelten R_S-Werte schon ein deutliches Abweichen von der normalen Michaelis-Menten-Kinetik erkennen. So ergibt sich für die in Abhängigkeit von der APS-Konzentration gemessenen Anfangsraten in Abb. 14a ein R_S zwischen 23 und 26. Signifikanter als bei diesen hohen Substratkonzentrationen, wo eine hohe Empfindlichkeit der Enzymkatalyse gegenüber den Substraten von keinem großen Nutzen wäre, ist der nicht-hyperbolische Verlauf der Abhängigkeit der Umsatzraten vom Substrat bei Messungen im Bereich der K_M-Werte erkennbar, d.h. bei Konzentrationen,

die den physiologischen in-vivo-Bedingungen entsprechen. So ergab sich für die in Abb. 15a dargestellten Messungen ein R_s-Wert von 7-8, was für eine hohe Kooperativität sprechen würde. Dies wird noch deutlicher, wenn man die entsprechenden Lineweaver-Burk-Auftragungen (Abb. 15b) betrachtet. Die nicht-linearen Kurvenverläufe zeigen ebenfalls an, daß die Enzymkatalyse einer starken positiven Kooperativität unterworfen ist. Darüberhinaus läßt sich aus der graphischen Darstellung heraus zeigen, daß der app. K_s-Wert für APS mit steigenden APS-Konzentrationen kleiner wird. Mit anderen Worten, die Bindung eines Moleküls APS erhöht die Affinität des Enzyms für das nächste, was bei der geringen Gleichgewichtskonzentration des APS in der Zelle sicherstellt, daß das APS im Moment des Entstehens weitermetabolisiert werden kann. Daß trotz dieser wahrscheinlich hohen Kooperativität kein eindeutig sigmoider Kurvenverlauf zu erkennen ist, liegt vor allem daran, daß die variierten Substratkonzentrationen sehr viel größer waren, als die K_s-Werte. Weiterhin führen kleine Fehler bei Messungen im Bereich der K_s-Werte dazu, daß die Sigmoidität völlig übersehen wird.

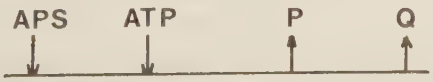
Nähere Aufschlüsse über die Zahl der Bindungsstellen ergaben sich durch Hill-plots. Für APS konnte dabei ein n_H von 6 ermittelt werden, was durch Auftragungen nach Eadie-Scatchard unterstützt wurde. Steigende Mengen von ATP verschlechterten den K'-Wert für APS. Da der n_H-Wert die minimale Anzahl von Bindungsstellen wiedergibt, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die tatsächliche Zahl noch höher liegt. Hinweise auf eine negative Kooperativität durch ATP ergaben die Hill-plots für ATP. Die Auftragungen waren nicht linear über den gesamten Konzentrationsbereich, sondern es ergab sich im Bereich von 0,25 K_s bis 1 K_s ein n_H von 1, während bei niedrigen und hohen ATP-Konzentrationen ein n_H von 4 errechnet wurde. Eine solche negative Kooperativität ist für eine Anzahl von allosterischen Enzymen bekannt wie Desoxythymidin-Kinase, Lactat-Dehydrogenase oder GAP-Dehydrogenase. Geht man jedoch davon aus, daß die Bestimmung der Umsatzraten bei sehr geringen ATP-Konzentrationen mit einem größeren Fehler behaftet ist, so könnte der Verlauf der Hill-plots dahingehend interpretiert werden, daß die Zahl der Bindungsstellen für ATP erhöht wird, sobald die Konzentration an ATP in den Bereich des

K_s-Wertes des Enzyms für ATP kommt. D.h. ist das Phosphorylierungs-Potential der Zelle genügend hoch, so wird durch eine Erhöhung der Zahl der Bindungsstellen die Aktivität des Enzyms positiv beeinflußt. Dies würde unterstützt durch den positiv kooperativen Effekt von APS auf die Katalyse. Die Bindung von APS verringerte nicht nur den K_s-Wert für APS, sondern aus den Hill-plots ergab sich für APS kleiner 10 uM auch ein positiv kooperativer Effekt auf den K'-Wert für ATP.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die ermittelten kinetischen Daten für die APS-Kinase-Reaktion in vitro eine besonders hohe Affinität des Enzyms zu seinen Substraten erkennen liessen. In Anbetracht der beschriebenen Gleichgewichtskonzentration von 10^{-5}M für APS (Siegel 1975) ermöglicht der K_M-Wert von 0,2 uM, daß APS im Moment des Entstehens weitermetabolisiert werden kann. Die hohe Kooperativität der Katalyse entspricht der in-vivo-Bedeutung des Enzyms, auch bei der sehr schlechten Gleichgewichtslage der ATP-Sulfurylase-Reaktion APS zu PAPS umzusetzen und so die Bereitstellung eines Sulfonylgruppen-Donors für die Reduktion zu gewährleisten (s. Einleitung). Neben der Tatsache, daß geringste Mengen an APS die Affinität des Enzyms für APS noch weiter erhöhten, ist der Einfluß des pH-Wertes und von Reduktionsmitteln auf die Aktivität des Enzyms von Bedeutung. Die Biosynthese von PAPS in einem leicht sauren Milieu und in Gegenwart von Reduktionsmitteln ist sehr gut korrelierbar mit den Bedingungen für die weiteren Umsetzungsschritte für PAPS.

Wie aus den bisherigen Ausführungen ersichtlich wurde, folgt die APS-Kinase-Reaktion einem sequentiellen Mechanismus, wobei es als wahrscheinlich angenommen werden muß, daß es dabei zu kooperativen Beeinflussungen der Substratbindungsstellen kommt. Die Ergebnisse lassen weiterhin den Schluß zu, daß die Bindung der Substrate "ordered" erfolgt, wobei APS vor ATP gebunden wird.

Die Messungen der Anfangsraten in Gegenwart der Produkte sollten einerseits diese Ergebnisse bestätigen, andererseits weiteren Aufschluß über die Reihenfolge der Freisetzung der Produkte geben. Aus der Cleland'schen Schreibweise für eine ordered-BiBi-Reaktion wird deutlich,



P = ADP o. PAPS

Q = PAPS o. ADP

daß lediglich Q und APS mit derselben Enzymform reagieren können und daher Q kompetitiver Inhibitor für die APS-Bindung sein sollte.

Für einen solchen Mechanismus wäre bei den in Kap. 2.4.5. gewählten Versuchsbedingungen folgendes Produkthemmungsmuster zu erwarten gewesen:

	A P S	A T P
P	mixed-type	mixed-type
Q	kompetitiv	---

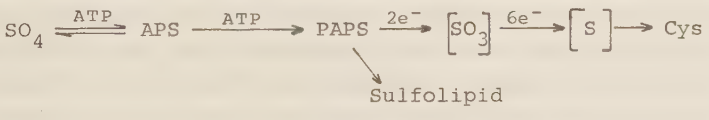
Die in den Versuchen ermittelten Veränderungen der Anfangsraten in Gegenwart von ADP und PAPS ergaben jedoch sowohl für ADP als auch für PAPS eine "mixed-type"-Inhibierung der APS-Bindung. Wegen der beobachteten Kooperativität zwischen den beiden Substratbindungsstellen, insbesondere hinsichtlich des stark positiv kooperativen Effekts von APS auf die Katalyse, kann aber das tatsächlich gefundene Produkthemmungsmuster durchaus von der Erwartung abweichen, ohne daß der Mechanismus der Katalyse prinzipiell verändert worden ist.

Daraus ergibt sich weiterhin, daß die Reihenfolge der Freisetzung der Produkte nicht eindeutig festgelegt werden kann. Allerdings könnten die unterschiedlichen K_i-Werte von PAPS und ADP in Bezug auf die APS-Bindung dafür sprechen, daß ADP als letztes Produkt vom Enzym freigesetzt wird. Aus diesen Überlegungen heraus wird daher für die Enzymkatalyse folgender Mechanismus diskutiert:

3.4. Physiologie der APS-Kinase

Aus den Messungen der isolierten APS-Kinase (Kap. 2.4.) ergaben sich die folgenden in-vitro-Eigenschaften des Enzyms. Die Affinität zu den Substraten war sehr hoch. Die Konsequenz aus dem beobachteten positiv homotropen Effekt, den geringste APS-Konzentrationen hervorriefen, ist, daß APS im Moment des Entstehens sofort zu PAPS umgesetzt werden kann. Für die enzymatische Aktivität konnte eine Abhängigkeit vom pH-Wert, vom Dissoziationsgrad der Protein-SH-Gruppen sowie von Adenosinnukleotiden beobachtet werden. Daraus folgt, daß APS in einem leicht sauren Milieu und geringen Konzentrationen an ATP zu PAPS metabolisiert wird. Dabei wurde eine Akkumulation von PAPS nur beobachtet, wenn die Kinase als lösliches Protein vorlag.

Diese Eigenschaften des isolierten Enzyms entsprechen der notwendigen in-vivo-Funktion der APS-Kinase. Da das Gleichgewicht der ATP-Sulfurylase-Reaktion nur die Anhäufung von APS in Konzentrationen von 10^{-5}M erlaubt (Siegel 1975), muß gewährleistet sein, daß das gebildete APS sofort weiter umgesetzt werden kann. Das gebildete PAPS könnte als universeller Sulfonylgruppen-Donor sowohl für die assimilatorische Sulfatreduktion als auch für die Sulfolipid-Bildung und die Synthese von Sulfatestern dienen. Dabei wäre das dafür notwendige Vorliegen von Reduktionsmitteln wiederum ein positiver Effektor der APS-Kinase-Reaktion. Der Ablauf der assimilatorischen Sulfatreduktion aufgrund dieser Überlegungen ist in Schema I dargestellt:

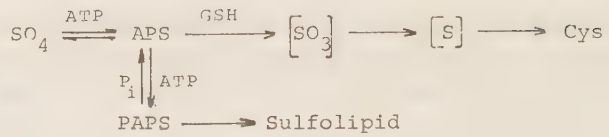


(I)

Von Schiff und Mitarbeitern (Tsang und Schiff 1976d) sowie den Arbeitsgruppen um Schmidt (Schmidt 1975, 1976) und Brunold (Brunold und Schmidt 1976, Jenni et al 1980) wurde ein alternativer Stoffwechselweg vorgeschlagen (Schema II). Dabei handelt es sich um die Thiol-abhängige Bildung von Sulfit aus APS. Als Thiol sind dabei sowohl physiologische (GSH) als auch artifi-

fizielle Verbindungen (DTE, DTT) aktiv :

(II)



Nach dieser Hypothese dient PAPS nur als Sulfonylgruppen-Donor für Sulfatester bzw. für die Sulfolipid-Bildung, während die assimilatorische Sulfatreduktion über die APS-Sulfotransferase läuft. Für das Enzym aus Spinat konnte Schmidt einen K_M von 13 µM ermitteln (Schmidt 1976).

Da es sich bei dieser Sulfotransferase-Aktivität um eine direkte Konkurrenzreaktion zur Aktivität der APS-Kinase um das gebildete APS handelt, muß zwischen beiden Enzymen eine regulatorische Kooperativität bestehen, die entweder auf einer metabolischen Steuerung oder der strukturgebundenen Organisation beruhen könnte. Hinweise auf eine strukturelle Organisation ergaben sich bereits in den Vorversuchen in Kap. 2.2.

In Algen und höheren Pflanzen konnte gezeigt werden, daß die assimilatorische Sulfatreduktion im Chloroplasten lokalisiert ist (Schmidt und Schwenn 1971, Schwenn und Trebst 1976). Bei der Isolierung der APS-Kinase aus Algen und phototrophen Bakterien zeigte sich, daß nach einem osmotischen Aufbrechen der Zellen nur geringe Enzymaktivität meßbar war. Vielmehr konnte eine Akkumulation von PAPS nur dann beobachtet werden, wenn das Enzym durch Ultraschallbehandlung freigesetzt worden war. Das steht im Einklang mit Untersuchungen von Burnell und Anderson an Spinatchloroplasten (Burnell und Anderson 1973), die APS-Kinase-Aktivität ebenfalls nur nach Behandlung mit Ultraschall in den Chloroplasten fanden. Sie vermuteten daher, daß das Enzym membrangebunden in den Thylakoiden vorliegt. Übereinstimmend damit konnten Schwenn und andere zeigen (Schwenn und Hennies 1974, Schwenn et al 1976), daß an der Bildung von austauschbarem Sulfit sowohl lösliche Enzyme des Stroma als auch membrangebundene Enzyme beteiligt sind. Dies konnte in den eigenen Versuchen weiter unterstützt werden, da auch nach der Trennung von löslichem Zellprotein und Membra-

nen noch APS-Kinase in den Membranfragmenten meßbar war. Ferner war die Aktivität der löslichen APS-Kinase nach der Entfernung der Partikel erhöht. Während die gereinigte Kinase nicht durch 3'5'PAP beeinflußt wurde, konnte in den Partikeln die nachweisbare Menge an PAPS durch 3'5'PAP um 70% erhöht werden. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von Hodson und Mitarbeitern, die zeigen konnten, daß PAP in zellfreien Extrakten aus Chlorella den Abbau von PAPS hemmt (Hodson et al 1968).

Diese Ergebnisse können dahingehend interpretiert werden, daß andere membrangebundene Enzyme oder Enzymsysteme das gebildete PAPS sofort weitermetabolisieren. Dabei könnte es sich um einen Teil des großen Enzymkomplexes handeln, der in Partikeln aus Catharanthus roseus nachgewiesen wurde (Urlaub und Jankowski 1982). Aus einem solchen Komplex kann durch entsprechende Aufarbeitungsmethoden ein zusammenhängendes Enzymsystem freigesetzt werden, das sowohl APS-Sulfotransferase- als auch APS-Kinase-Aktivität besitzt. Dabei konnte gezeigt werden, daß die kleinste Untereinheit der löslichen Kinase (45.000 dalton nach SDS-Page) vollständig von der Sulfotransferase-Aktivität durch Gelfiltration abgetrennt werden konnte, wobei das Aktivitätsmaximum der Transferase mit 285.000 dalton in dem gleichen Molekulargewichtsbereich lag, wie er für den APS-Kinase/PAPS-Reduktase-Komplex aus Nitrobacter beschrieben wurde (Varma und Nicholas 1971).

Da die Sulfotransferase-Aktivität demgegenüber nie frei war von APS-Kinase, kann nicht ausgeschlossen werden, daß beide Aktivitäten strukturgebunden in einem Komplex vorliegen, aus dem die Kinase durch Ultraschall oder Behandlung mit Chelatbildnern freigesetzt werden kann. Dies konnte gezeigt werden, indem durch Rechromatographieren der Transferase-Aktivität mit einem app. Molekulargewicht von 285.000 dalton erneut Kinase freigesetzt wurde, die als lösliches Protein mit einem Molekulargewicht von 95.000 dalton abgetrennt werden konnte, während das Maximum der Transferase-Aktivität dann bei 190.000 dalton lag.

Die genannten Methoden ermöglichten jedoch keine vollständige Freisetzung der APS-Kinase, vielmehr besitzt auch eine 800-fach gereinigte APS-Sulfotransferase noch ausreichende Kinase-Aktivität, um die Versorgung mit aktiviertem Sulfat für die Reduktion sicherzustellen. Auch die gleichzeitige kinetische Bestimmung

beider Enzymaktivitäten in teilweise gereinigten Extrakten wies darauf hin, daß zunächst PAPS gebildet wurde, welches erst dann akkumulierte, wenn das austauschbare Sulfit ein "steady-state"-Niveau erreichte.

Bei den Vertretern der Enterobakterien wie E.coli oder Salmonella sind die Enzyme der Sulfataktivierung und -reduktion nicht strukturgebunden, sondern liegen als lösliche Zellproteine vor. Auch ist hier die Frage nach dem Sulfonylgruppen-Donor für die Reduktion zugunsten von PAPS geklärt. Strittiger ist die Frage bei den phototrophen Bakterien. Für die Athiorhodaceen (Rhodospirillaceae) ist bekannt, daß sie zur assimilatorischen Sulfatreduktion befähigt sind (Cooper und Trüper, unveröff., Ibanez und Lindstrom 1959,1962), wobei sowohl APS als auch PAPS als Sulfonylgruppen-Donor für die Reduktion vorgeschlagen wurden (Schmidt und Trüper 1977). Die Aktivität einer APS-Kinase in Rhodopseudomonas sulfidophila konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, wobei die kinetischen Daten der Reaktion weitgehend denen des Algenenzyms entsprachen. Bei den Thiorhodaceen (Chromatiaceae) war man lange der Meinung, daß sie standortbedingt keine assimilatorische Sulfatreduktion betreiben könnten (Thiele 1966, Trüper und Jannasch 1968, Trüper und Schlegel 1974). Der beobachtete Einbau von $^{35}S\text{-}SO_4$ in Cystein (Thiele 1966) wurde durch die hohe APS-Reduktase-Aktivität erklärt, die von verschiedenen Autoren in den Chromatophoren von Thiorhodaceen gefunden wurde (Trüper und Peck 1970, Schwenn und Biere 1979). Es konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden, daß Chromatium vinosum APS-Kinase besitzt, was die Beobachtungen von Hoppe (Hoppe, unveröff.) bestätigt.

Zusammenfassend kann man die vorliegenden Ergebnisse dahingehend interpretieren, daß die APS-Kinase und die APS-Sulfotransferase-Aktivität einen gemeinsamen Komplex bilden, aus dem die APS-Kinase herausgelöst werden kann. Es ist dabei nicht auszuschließen, daß dieser Komplex Teil einer größeren, membrangebundenen Struktureinheit ist, wie sie für Catharanthus roseus beschrieben wurde (Urlaub und Jankowski 1982). In der phylogenetischen Entwicklung von den Enterobakterien über die phototrophen Bakterien bis zu den Algen und höheren Pflanzen scheint diese strukturelle Organisation eine stetig steigende Komplexi-

tät erfahren zu haben. Ein Nachweis der auftretenden Zwischenprodukte (PAPS, SO_3, S) ist nur dann möglich, wenn die entsprechenden Enzymkomponenten aus dem Gesamtverband entfernt werden. Dabei erweist es sich als besonders schwierig, Sulfataktivierung und -transfer vollständig voneinander zu trennen, was sich insbesondere bei den Untersuchungen an Zellkulturen höherer Pflanzen zeigte. Doch kann aus den Messungen an einer hochgereinigten APS-Sulfotransferase sowie aus der Bestimmung beider Enzymaktivitäten nebeneinander geschlossen werden, daß die in der Sulfotransferase enthaltene Kinase aufgrund der kinetischen Eigenschaften, wie sie für das gereinigte, lösliche Enzym bestimmt wurden, ausreichende Mengen an aktiviertem Sulfat bildet, so daß PAPS als universeller Sulfonylgruppen-Donor dienen könnte.

4. Zusammenfassung

Die APS-Kinase (E.C. 2.7.1.25) wurde aus der einzelligen Grünalge Chlamydomonas reinhardtii isoliert und 550-fach angereichert. Durch die Entwicklung einer Trennmethode für Adenosinnukleotide mit Hilfe der Rversed-Phase HPLC konnte das PAPS als Reaktionsprodukt direkt gemessen werden. Der Verzicht auf die bisher veröffentlichten gekoppelten enzymatischen Testsysteme ermöglichte Anfangsraten-Messungen des isolierten Enzyms und erlaubte daher Aussagen über die Kinetik der durch die APS-Kinase katalysierten Bildung von PAPS aus ATP und APS.

Die Bildung von PAPS verlief optimal bei einem pH von 6.5-6.8, und damit nur etwas oberhalb des ermittelzen pI-Wertes von 6.2. Außerdem benötigt das Enzym reduzierte SH-Gruppen am oder im aktiven Zentrum, was durch den positiven Einfluß von Sulfit und Dithiolen und die Hemmung durch SH-Gruppen-spezifische Hemmstoffe gezeigt werden konnte.

Die erhaltenen kinetischen Konstanten der Reaktion in vitro lassen eine sehr hohe Affinität des Enzyms zu seinen Substraten erkennen. Die ermittelten K_M-Werte betrugen für ATP 8 uM und für APS 0,2 uM. Von den übrigen Purin- und Pyrimidinnukleotiden konnte lediglich CTP die Aktivität ähnlich gut unterstützen wie ATP. Geringste Mengen an APS wirkten positiv kooperativ auf die Enzymkatalyse. Zusammen mit der hohen Affinität für die Substrate ermöglicht die hohe Kooperativität der Substratbindungsstellen untereinander auch bei der ungünstigen Gleichgewichtslage der ATP-Sulfurylase-Reaktion die Umsetzung von APS zu PAPS und damit die Bereitstellung eines Sulfonylgruppen-Donors für die Reduktion. Aus Bindungsstudien und den Messungen der Anfangsraten in An- und Abwesenheit der Produkte ergibt sich ein Ordered-BiBi-Mechanismus für die Reaktion der APS-Kinase, wobei APS als erstes Substrat gebunden werden muß.

Es wurden weiterhin die Beziehungen zwischen der APS-Kinase und der von verschiedenen Autoren beschriebenen APS-Sulfotransferase-Aktivität näher untersucht. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß bei der Aufarbeitung der Zellen APS-Kinase und APS-Sulfotransferase als gemeinsamer Komplex isoliert werden, aus dem die Kinase durch Behandlung mit Ultraschall und Chelatbildnern freigesetzt werden und als lösliches Protein mit einem Molekulargewicht von 45.000 bzw. 90.000 für das Dimer abgetrennt werden konnte. Demgegenüber konnte gezeigt werden, daß auch eine hochgereinigte APS-Sulfotransferase noch immer genügend APS-Kinase-Aktivität besitzt, um die Versorgung mit aktiviertem Sulfat sicherzustellen. Kinetische Bestimmungen beider enzymatischer Aktivitäten lassen ebenfalls den Schluß zu, daß zunächst PAPS vor der eigentlichen Reduktion gebildet wird.

5. Methoden

5.1. Anzucht der Organismen

Chlamydomonas reinhardtii

Schrägagar-Kulturen der Mutante CW 15 wurden von Dr. L.M. Morgenthaler, Bern, zur Verfügung gestellt. Die Anzucht erfolgte in Kulturröhren mit 250 ml Nährmedium. Für größere Enzympräparationen erfolgte die Anzucht in 10-Liter-Glasflaschen. Die Zusammensetzung des Mediums entsprach den Angaben von Gorman und Levene (1965). Durch die Kulturen wurde ein CO_2/Luftgemisch mit ca. 5% CO_2 geleitet. Die Algen wurden bei 25 °C und 3500 Lux gezogen und in der log-Phase des Wachstums geerntet.

Chromatium vinosum D

Chromatium vinosum D wurde photolithotroph in einem Medium nach Pfennig (Pfennig und Lippert 1966) gezogen in 1-Liter-Schraubflaschen bei 25 °C und 2500 Lux.

Rhodopseudomonas sulfidophila W4

Der Stamm W4 wurde von Prof. H.G. Trüper, Bonn, zur Verfügung gestellt. Die Kulturen wurden bei 25 °C und 2500 Lux in einem Medium gezogen, das bei Imhoff 1980 beschrieben ist.

Catharanthus roseus (L.)

Suspensionskulturen von Catharanthus roseus wurden auf einem Nährmedium nach Linsmaier und Skoog (1965) gezogen. Die Kulturen wuchsen N-mixotroph mit 20 mM Ammonium- und 40 mM Nitratstickstoff sowie S-autotroph mit 1,8 mM Sulfat.

Nicotiana tabacum

Suspensionskulturen von N. tabacum wurden von Dr. H. Rennenberg, Köln, zur Verfügung gestellt und in Erlenmeyer-Kolben bei 24 °C und 3000 Lux angezogen wie bei Bergmann 1976 beschrieben.

5.2. Herstellen von Rohextrakten

Chlamydomonas reinhardtii

50 Liter Algen wurden in der log-Phase des Wachstums geerntet durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 300 x g. Das Pellet wurde aufgenommen in einem Waschpuffer aus 400 mM Sorbit, 50 mM Tris/Cl pH 8.0 und 2.5 mM EDTA und erneut 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Die gewaschenen Algen wurden resuspendiert in einem hypotonischen Puffer aus 25 mM Imidazol/Cl pH 6.8 und 10 mM ß-MSH und 6 x 1 Minute beschallt (Branson Sonifier B12, Stufe 7). Das Sonicat wurde zur Trennung von Partikeln und löslichem Protein 30 Minuten bei 45.000 x g zentrifugiert und weiterverarbeitet wie in Kap. 2.3. beschrieben.

Bakterien

Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und nach einmaligem Waschen bei -20 °C gelagert. 20 g gefrorene Zellen wurden in 25 mM Imidazol/Cl pH 6.8/ 10 mM ß-MSH suspendiert und verarbeitet wie für C. reinhardtii beschrieben.

Zellkulturen

Das Kulturmedium wurde abgenutscht und das Gewebe mit Puffer (50 mM Tris/Cl pH 8.0, 1 mM EDTA, 10 mM ß-MSH) gewaschen. Die Zellen wurden in dem gleichen Puffer aufgenommen (1 ml Puffer/g Zellen) und 30 Sekunden im Waring Blendor bei höchster Stufe homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend 6 x 15 Sekunden beschallt (Branson Sonifier B12, Stufe 7) und 30 Minuten bei 45.000 x g zentrifugiert. Der Überstand S_{45} wurde weiterverarbeitet wie für die Algen beschrieben.

5.3. Biosynthese von ^{35}S-PAPS

Die Darstellung von ^{35}S-PAPS erfolgte enzymatisch mit Hilfe reiner ATP-Sulfurylase (Sigma Chem.) und gereinigter APS-Kinase aus Chlamydomonas reinhardtii. Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 10 ml: 0.25 mmole Tris/Cl pH 8.0,

20 µmole ATP, 30 µmole $MgCl_2$, 40 µmole Na_2SO_4, 0.5 U Pyrophosphatase, 0.25 U ATP-Sulfurylase, gereinigte APS-Kinase und trägerfreies ^{35}S-Sulfat. Nach 12 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von Methanol gestoppt und das Reaktionsgemisch an DEAE-Sephacel chromatographiert. Zur Elution diente ein linearer Gradient von 0-400 mM KCl in 25 mM Tris/Cl pH 8.0. Die PAPS-Fraktionen wurden gepoolt, am Rotationsverdampfer eingeengt und anschliessend über TSK HW 40 entsalzt.

5.4. Biosynthese von ^{35}S-APS

Die Synthese von ^{35}S-APS erfolgte aus ^{35}S-PAPS. Zu einer Lösung von ^{35}S-PAPS in 25 mM Tris/Cl pH 8.0 wurde reine 3'Nukleotidase (Sigma Chem.) zugesetzt und der Ansatz bis zur vollständigen Umsetzung im Wasserbad bei 30 °C inkubiert. Die Kontrolle des Umsatzes erfolgte mit Hilfe der reversed-phase HPLC. Das Gemisch aus ^{35}S-APS und P_i wurde anschließend an DEAE-Sephacel getrennt mit einem linearen Gradienten von 0-250 mM KCl in 25 mM Tris/Cl pH 8.0. Die APS-Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer eingeengt und durch Chromatographie an TSK HW 40 entsalzt.

5.5. Biosynthese von ^{32}P-ATP

Die Darstellung von ^{32}P-ATP erfolgte mit einer Suspension aus Spinatchloroplasten in einem PMS-zyklischen Ansatz. Der Reaktionsansatz enthielt in einem Volumen von 0.8 ml: 50 µmole Tricin/OH pH 8.5, 50 µmole NaCl, 10 µmole $MgCl_2$, 2 µmole Na-Ascorbat, 10 µg Chlorophyll, 50 nmole PMS, 10 nmole ADP und 20 µl trägerfreies Phosphat (Fa. Amersham). Der Ansatz wurde 5 Minuten belichtet mit 8×10^5 erg/cm^2 x sec. und danach mit 20 µmolen Phosphat vervollständigt und eine weitere Minute belichtet. Danach wurde die Reaktion gestoppt und der Ansatz an DEAE-Sephacel getrennt. Nach dem Einengen der ATP-Fraktionen wurde das ATP an TSK HW 40 entsalzt.

5.6. Bestimmung von austauschbarem Sulfit

Die Bestimmung erfolgte nach der von Schmidt (1976) beschriebenen Methode für die APS-Sulfotransferase. Das Überdestillieren erfolgte in Szintillationsgläschen mit 1 ml Trioctylamin zur Absorption des Sulfits.

5.7. Bestimmung von Nukleotiden mit HPLC

Die Trennung der Nukleotide erfolgte unter Verwendung der reversed-phase HPLC wie bei Schwenn und Jender 1980 beschrieben. Als Laufmittel diente 13% 2-Propanol, 6 mM Tetrabutylammoniumhydroxid eingestellt auf pH 9.8 mit o-Phosphorsäure. Die Messung der Radioaktivität und der UV-Absorption erfolgte in der gleichen Probe durch Ankoppelung einer Durchflußszintillationsmeßzelle. Die Probenaufgabe erfolgte automatisch durch einen Probensampler der Fa. Kontron. Die Auswertung des Verlaufs der Radioaktivität erfolgte mit Hilfe eines apple-II-Computers und der entsprechenden Meßapparatur der Fa. Isomess. Zur genauen quantitativen Bestimmung der Reaktionsprodukte wurden die radioaktiven Peaks fraktioniert und in einem Szintillationszähler gezählt.

5.8. SDS-Gradientengele

Die SDS-Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Chua (Chua 1980) durchgeführt. Herstellung der Gradientengele und Durchführung der Elektrophorese sind bei Johanningmeier (1981) beschrieben.

5.9. Ansätze zur Bestimmung der APS-Kinase-Aktivität

Wenn nicht besonders angegeben, enthielten die Reaktionsansätze 25 mM Imidazol/Cl pH 6.8, 1 mM $MgCl_2$, 8 mM Na_2SO_3 sowie ATP, APS und Enzym. Bei Messungen in Rohextrakten wurden die Ansätze gestoppt durch Zugabe von 2-Propanol (30% Endkonzentration). Bei Messungen der gereinigten Kinase konnte die Reaktion nicht mehr

durch Alkohol gestoppt werden, sondern mußten in flüssigem N_2 eingefroren werden. Aliquots wurden nach dem Auftauen direkt analysiert.

5.10. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteins erfolgte entweder nach der Methode von Bradford (1976) oder mit einer modifizierten Lowry-Methode nach Besadoun und Weinstein (1976).

6. Literatur

(1) Arnon, D.I., Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol-oxidase in Beta vulgaris
Plant Physiol. 24 (1949) 1-15

(2) Asahi, T., Sulfur metabolism in higher plants. IV. Mechanism of sulfate reduction in chloroplasts
Biochim. Biophys. Acta 82 (1964) 58-66

(3) Bandurski, R.S., Biological reduction of sulfate and nitrate in: Plant biochemistry, pp 467-490, Bonner,J.,Varner,J.E. editors Academic Press 1965

(4) Bergmann, L., et al, Einfluß von Ammonium und Nitrat aus Stickstoff-Metabolismus, Malatanhäufung und Malatenzym-Aktivität in Suspensionskulturen von Nicotiana tabacum
Z. Pflanzenphys. 80 (1976) 60-70

(5) Besadoun, A., Weinstein, D., Assay of proteins in the presence of interfering materials
Analyt. Biochem. 70 (1976) 241-250

(6) Boyer, P.D., Pyruvate kinase
in: The Enzymes Vol VI, p. 95-113, Academic Press 1962

(7) Boyer, P.D., The Enzymes. Student edition Academic Press 1970

(8) Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254

(9) Burnell, J.N., Anderson, J.W., Adenosine 5'-sulphatophosphate kinase activity in spinach leaf tissue
Biochem. J. 134 (1973) 565-579

(10) Burnell, J.N., Whatley, F.R., A new, rapid and sensitive assay for adenosine 5'-phosphosulphate(APS)-kinase
Anal. Biochem. 68 (1975) 281-288

(11) Chua, N.H., Electrophoretic Analysis of Chloroplasts Proteins
in: Methods of Enzymology Vol 69c, pp 434-446, San Pietro ed., Academic Press 1980

(12) Cleland, W.W., The kinetics of enzyme catalyzed reactions with two or more substrates or products
Biochim. Biophys. Acta 67 (1963) 104-137

(13) Dixon, M., Webb, E.C., Enzymes. Longman 1979

(14) Gorman, D.S., Levene, R.T., Cytochrome f and plastocyanin: Their sequence in the photosynthetic electron transport chain of Chlamydomonas reinhardtii

Proc. Natl. Acad. Sci USA 54 (1965) 1665-1669

(15) Gulbinsky, J.S., Cleland, W.W., Kinetic studies of E.coli galactokinase

Biochemistry 7 (1968) 566-575

(16) Hammes, G.G., Kochavi, D.,

J. Amer. Chem. Soc. 84 (1962) 2069-2073

(17) Hilz, H., Kittler, M., Reduction of active sulfate (PAPS) by dihydrolipoic acid as substrate

Biochem. Biophys. Res. Comm. 3 (1960) 140-142

(18) Hodson, R.C., et al, Studies of sulfate utilization by algae. 6. PAPS as an intermediate in thiosulfate formation from sulfate by cell-free extracts of Chlorella

Plant Physiol. 43 (1968) 563-569

(19) Hodson, R.C., Schiff, J.A., Preparation of PAPS: An improved enzymatic method using Chlorella pyrenoidosa

Arch. Biochem. Biophys 132 (1969) 151-156

(20) Ibanez, M.L., Lindstrom,E.S., Photochemical sulfate reduction by Rhodospirillum rubrum

Biochem. Biophys. Res. Comm. 1 (1959) 224-227

(21) Ibanez, M.L., Lindstrom, E.S.,Metabolism of sulfate by the chromatophore of Rhodospirillum rubrum

J. Bacteriol. 84 (1962) 451-455

(22) Imhoff, J.F., Aspekte des assimilatorischen Sulfatstoffwechsels in Rhodospirillaceae

Thesis Bonn 1980

(23) Jender, H.G., Über die Reduktion von aktiviertem Sulfat durch eine Sulfotransferase in höheren Pflanzen

Staatsexamen Bochum 1979

(24) Johanningmeier, U., Identifizierung von Bindeproteinen in der Plastochinon-Region der Thylakoidmembran

Thesis Bochum 1981

(25) Kemena, A., Zur Entwicklung der Sulfit- und Nitritreduktase in Zellkulturen von Catharanthus roseus (L.)

Thesis Bochum 1981

(26) Kredich, N.M.,Regulation of L-cysteine biosynthesis in Salmonella typhimurium

J. Biol. Chem. 246 (1971) 3474-3484

(27) Linsmaier, E.M., Skoog, F., Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures

Physiol. Plant. 18 (1965) 100-127

(28) Mercer, E., et al, Occurrence of a 3'-Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate synthesizing system in two Ochromonas species

Phytochem. 13 (1974) 1297-1302

(29) Mercer, E., Thomas, G., The occurrence of ATP-adenylylsulphate 3'-phosphotransferase in the chloroplasts of higher plants

Phytochem. 8 (1969) 2281-2285

(30) Miller, R.L., et al, Adenosine kinase from rabbit liver. I. Purification by affinity chromatography and properties

J. Biol. Chem. 254 (1979) 2339-2345

(31) Møller, M.E., Evans, L.V., Sulphate activation in the unicellular red alga Rhodella

Phytochem. 15 (1976) 1623-1626

(32) Morrison, J.F., James, E., The mechanism of the reaction catalysed by Adenosine Triphosphate-Creatine Phosphotransferase

Biochem. J. 97 (1965) 37-52

(33) Mourad, N., Parks, R.E., Erythrocytic nucleoside diphosphokinase

J. Biol. Chem. 241 (1966) 271-278

(34) Pfennig, N., Lippert, K.D., Über das Vitamin B_{12}-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien

Arch. Mikrobiol. 55 (1966) 245-256

(35) Ragland, J.B., The role of ATP-sulfurylase in the biosynthesis of cysteine and methionine by Neurospora

Arch. Biochem. Biophys. 84 (1959) 541-542

(36) Robbins, P.W., Lipman, F., Separation of two enzymatic phases in active sulfate synthesis

J. Biol. Chem. 233 (1958) 681-686

(37) Robbins, P.W., Sulfate-activating enzymes

in: S.P. Colowick, N.O. Kaplan, Methods of enzymology Vol V, Academic Press 1962, pp. 964-977

(38) Sawhney, J.K., Nicholas, D.J.D., Studies on the degradation of APS and PAPS in extracts of Anabaena cylindrica

Plant Sci. Lett. 6 (1976) 103-110

(39) Schedel, M., et al, Siroheme sulfit reductase from Chromatium vinosum

Arch. Microbiol. 121 (1979) 29-36

(40) Schiff, J.A., Physiology and biochemistry of algae

Academic Press 1962, pp. 239-246

(41) Schmidt, A., On the mechanism of photosynthetic sulfate reduction. An APS-Sulfotransferase from Chlorella

Arch. Mikrobiol. 84 (1972) 77-86

(42) Schmidt, A., Über Teilreaktionen der photosynthetischen Sulfatreduktion in zellfreien Systemen aus Spinatchloroplasten und Chlorella

Z. Naturforsch. 27b (1972a) 183-193

(43) Schmidt, A., A sulfotransferase from spinach leaves using APS

Planta 124 (1975) 267-275

(44) Schmidt, A., The adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase from spinach. Stabilization, partial purification and properties

Planta 130 (1976) 257-263

(45) Schmidt, A.,

FEMS Microbiol Lett. 1 (1977) 137-140

(46) Schmidt, A., A phosphatase from Chlorella dephosphorylating PAPS to APS

Plant Sci. Lett. 13 (1978) 193-199

(47) Schmidt, A., Trüper, H.G., Reduction of adenylylsulfate and 3'phosphoadenylylsulfate in photosynthetic bacteria

Experientia 33 (1977) 1008-1010

(48) Schmidt, A., Schwenn, J.D., On the mechanism of photosynthetic sulfate reduction

in: Proc. IInd Int. Congr. Photosynthesis Stresa 1971 pp. 507-514, Forti, G., Avron, M., Melandri, eds. The Hague, W.Junk 1971

(49) Schwenn, J.D., Untersuchungen zur Kinetik der photosynthetischen Sulfatreduktion

Thesis Bochum 1970

(50) Schwenn, J.D., Hennies, H.H., Enzymes and bound intermediates involved in photosynthetic sulfate reduction of spinach chloroplasts and Chlorella

in: Proc. 3rd Int. Congr. Photosynth. Rehovot M. Avron, ed., p 629-635, Elsevier 1975

(51) Schwenn, J.D., et al, Assimilatory sulfate reduction in chloroplasts: Evidence for the participation of both stromal and membrane-bound enzymes

Plant & Cell Physiol. 17 (1976) 165-176

(52) Schwenn, J.D., Trebst, A., Photosynthetic sulfate reduction by chloroplasts

in: The intact chloroplast, J. Barber, ed., 315-334 Elsevier 1976

(53) Schwenn, J.D., Biere, M., APS-reductase activity in the chromatophores of Chromatium vinosum D

FEMS Lett. 6 (1979) 19-22

(54) Schwenn, J.D., Jender, H.G., Reversed-phase HPLC of adenine nucleotides: Application to the kinètics of a PAPS-sulfotransferase from plants

J. Chromatogr. 193 (1980) 285-290

(55) Schwenn, J.D., Jender, H.G., A kinetic investigation of the APS-kinase from Chlamydomonas reinhardtii CW 15

Phytochem. 20 (1981) 601-604

(56) Schwenn, J.D., Urlaub, H., Recent results on the assimilatory sulfate reduction: APS-kinase and the reduction of APS to cysteine in higher plants

in: Biology of inorganic nitrogen and sulfur. H. Bothe, A. Trebst, eds., pp 334-340, Springer 1981

(57) Shaw, W.H., Anderson, J.W., Purification, properteies and substrate specifity of adenosinetriphosphate sulfurylase from spinach leaf tissue

Biochem. J. 127 (1972) 237-247

(58) Segel, I.H., Enzyme kinetics. Wiley 1975

(59) Siegel, L.M., Biochemistry of the sulfur cycle

in: Greenberg, D.M., Metabolic pathways Vol. VII Academic Press 1975, p. 217-286

(60) Thiele, H.H., Wachstumsphysiologische Untersuchungen an Thiorhodaceae: Wasserstoff-Donatoren und Sulfatreduktion

Thesis Göttingen 1966

(61) Torii, K., Bandurski, R.S., Yeast sulfate-reducing system III. An intermediate in the reduction of PAPS to sulfite

Biochim. Biophys. Acta 136 (1967) 286-295

(62) Trudinger, P.A., Assimilatory and dissimilatory metabolism of inorganic sulfur compounds by microorganisms

in: Adv. in microbial physiology Vol. 3, p 111-152 A.H.Rose und J.F.Wilkinson eds., Academic Press 1969

(63) Trüper, H.G., Jannasch, H.W., Chromatium buderi nov. spec., eine neue Art der "grossen" Thiorhodaceae

Arch. Mikrobiol. 61 (1968) 363-

(64) Trüper, H.G., Peck, H.D., Formation of adenylylsulfate in phototrophic bacteria

Arch. Mikrobiol. 73 (1970) 125-

(65) Trüper, H.G., Schlegel, H.G., Sulphur metabolism in Thiorhodaceae: I. Quantitative measurements on growing cells of Chromatium okenii

J. Microbiol. Serol. 30 (1964) 225-

(66) Tsang, M.L.-S., Schiff, J.A., Studies of sulfate utilization by algae. 14. Distribution of PAPS and APS sulfotransferases in assimilatory sulfate reducers

Plant Sci. Lett. 4 (1975) 301-307

(67) Tsang, M.L.-S., Schiff, J.A., Sulfate-reducing pathway in E. coli involving bound intermediates

J. Bacteriol. 125 (1976a) 923-933

(68) Tsang, M.L.-S., Schiff, J.A., Properties of enzyme fraction "A" from Chlorella and copurification of 3'(2'), 5'-bisphosphonucleoside 3'(2') phosphohydrolase, adenosine 5'-phosphosulfate sulfohydrolase and adenosine 5'-phosphosulfate cyclase activities

Eur. J. Biochem. 65 (1976b) 113-121

(69) Tsang, M.L.-S., et al, Preparation of APS from PAPS prepared by an improved procedure

Anal. Biochem. 74 (1976c) 623-626

(70) Tsang, M.L.-S., Schiff, J.A.,

Plant & Cell Physiol. 17 (1976d) 1209-

(71) Urlaub, H., Jankowski, G., Sulfate reduction in Catharanthus roseus (L.)

Planta 155 (1982) 154-161

(72) Varma, A.K., Nicholas, D.J.D., Metabolism of ^{35}S-sulfate and properties of APS-kinase and PAPS-reductase in Nitrobacter agilis

Arch. Mikrobiol. 78 (1971) 99-117

(73) Webb, E.C., Morrow, P.F.W., The activation of an arylsulfatase from ox liver by chloride and other anions

Biochem. J. 73 (1959) 7-15

(74) Wilson, L.G., Bierer, D., The formation of exchangeable sulphite from adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulphate in yeast

Biochem. J. 158 (1976) 255-270

Herrn Prof. Dr. Trebst danke ich für die Überlassung des Themas und die Arbeitsmöglichkeiten, die mir bei der Anfertigung der Arbeit zur Verfügung standen.

Herrn Dr. Schwenn bin ich für die Betreuung meiner Arbeit zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 8. März 1953 wurde ich als Sohn der Eheleute Georg und Elisabeth Jender in Herne geboren.

Nach Ende der vierten Klasse der Volksschule besuchte ich von 1963 an die Städt. Realschule f. Jungen und Mädchen. Mit Absolvierung der Mittleren Reife wechselte ich zum mathem.-naturwiss. Otto-Hahn-Gymnasium, wo ich 1972 das Zeugnis der Reife erwarb.

Von 1972 bis 1974 leistete ich meinen Wehrdienst als Soldat auf Zeit bei der Luftwaffe.

Zum Wintersemester 1974/75 nahm ich das Studium der Biologie und Chemie an der Justus-Liebig-Universität in Gießen auf und wechselte zum Sommersemester 1975 zur Ruhr-Universität-Bochum. Dort war ich von Herbst 1978 bis Sommer 1979 mit experimentellen Arbeiten für das Staatsexamen am Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen bei Herrn Prof. Dr. Trebst beschäftigt. Nach dem erfolgreichen Abschluß des Staatsexamens für das Lehramt für die Sekundarstufe II im Jahre 1980 begann ich am Lehrstuhl von Herrn Prof. Dr. Trebst mit den Arbeiten für die vorliegende Dissertation.

DER DRUCKER - Buscheystraße 138 - 4630 Bochum - Tel. (02 34) 70 41 16